

Université de Sherbrooke

**RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR DE TYPE 1 DES
CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES PAR L'INTERLEUKINE-33 DANS
LES LYMPHOCYTES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE HUMAIN**

Par
Marie Boudaud
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
2018

Membres du jury d'évaluation
Pr Marek Rola-Pleszczynski, directeur de thèse
Pre Jana Stankova, co-directrice de thèse
Pr Abdelaziz Amrani, programme d'immunologie
Pre Nancy Dumais, département de biologie, faculté des sciences
Pr Paul-Henri Naccache, département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, faculté de
médecine, Université Laval

© Marie Boudaud / 2018

RESUME

Régulation de l'expression du récepteur de type 1 des cystéinyl-leucotriènes par l'interleukine-33 dans les lymphocytes du sang périphérique humain

Par

Marie Boudaud

Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Au cours d'une réaction asthmatique, l'interleukine (IL)-33 est abondamment libérée par les cellules épithéliales et fibroblastiques endommagées des voies respiratoires. Suite à un clivage protéolytique, la cytokine est reconnue par son récepteur ST2L, exprimé à la surface des cellules immunes, conduisant à la production d'IL-5 et IL-13, à l'origine des caractéristiques immunes et symptomatiques de l'asthme. En plus des cytokines inflammatoires, les cystéinyl-leucotriènes (cysLTs) sont de puissants broncho-constricteurs et contribuent à l'inflammation de type Th2 dans le contexte de l'asthme. Les cysLTs sont des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique et incluent le leucotriène (LT)D₄, le LTC₄ et le LTE₄. La plupart des propriétés inflammatoires des cysLTs sont transduites par le récepteur CysLT1 dont l'expression à la surface des leucocytes est régulée par les cytokines de l'environnement inflammatoire. L'objectif de cette étude est d'explorer la régulation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 dans les lymphocytes du sang périphérique humain de donneurs en santé. Les résultats obtenus montrent que l'axe IL-33/ST2L/TAK-1 augmente l'expression du récepteur CysLT1 après un traitement de 9h avec 5ng/ml d'IL-33. Dans ces conditions, l'augmentation de l'expression de CysLT1 est accompagnée d'une augmentation de la mobilisation calcique et de la migration des lymphocytes T CD4⁺ en réponse au LTD₄. Pour la première fois, nous montrons que les lymphocytes T naïfs purifiés expriment ST2L et répondent à l'IL-33 en absence de stimulation du TCR. Contrairement aux cytokines connues pour pouvoir réguler l'expression de CysLT1 dans les leucocytes, l'IL-33 augmente l'expression de CysLT1 au niveau protéique mais pas au niveau de l'ARNm, suggérant une régulation post-transcriptionnelle. Après 7h30 de stimulation, l'IL-33 augmente le ratio d'expression du transcrit 1 par rapport au transcrit 4 de CysLT1. De plus, les inhibiteurs des voies de dégradation n'affectent pas l'augmentation d'expression du récepteur induite par la cytokine, appuyant l'hypothèse d'une régulation de l'épissage alternatif ou de la stabilité des transcrits de CysLT1 par l'IL-33. Cette étude contribue à élargir les connaissances sur les mécanismes immuns potentiellement impliqués dans la pathologie de l'asthme et propose des nouvelles perspectives dans l'étude de l'IL-33 et du récepteur CysLT1.

Mots clés : Interleukine-33, CysLT1, cystéinyl-leucotriènes, lymphocytes, asthme, épissage alternatif

SUMMARY

IL-33 upregulates cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression in human peripheral blood lymphocytes

By
Marie Boudaud
Immunology Program

Thesis presented to the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of philosophiae doctor degree (Ph.D.) in immunology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

During an asthmatic reaction, interleukin (IL)-33 is released as an alarmin by damaged airway epithelial cells and fibroblasts. Following a proteolytic cleavage, the cytokine binds to its specific receptor ST2L at the surface of leukocytes, leading to IL-5 and IL-13 release and initiating asthma-associated inflammation and symptoms. In addition to inflammatory cytokines, cysteinyl-leukotrienes (cysLTs) are potent bronchoconstrictors and take part in the type 2 inflammation in asthma. CysLTs are lipid mediators derived from arachidonic acid metabolism and include leukotriene (LT)_D₄, LTC₄ and LTE₄. Most of the inflammatory properties of cysLTs are transduced by CysLT1 receptor that is expressed by leukocytes and regulated by cytokines in the inflammatory environment. This study aimed to explore the regulation of CysLT1 expression by IL-33 in human peripheral blood lymphocytes from healthy donors. Results show that the IL-33/ST2L/TAK-1 pathway increased CysLT1 expression after 9h of stimulation with 5ng/ml of IL-33. CysLT1 upregulation was correlated with an increase in LTD₄-induced calcium mobilisation and migration in T CD4⁺ lymphocytes. Furthermore, we show, for the first time, that purified naïve T cells express ST2L and respond to IL-33 in the absence of TCR stimulation. Unlike other cytokines previously shown to regulate CysLT1 expression in leukocytes, IL-33 increased CysLT1 expression at the protein but not at the mRNA level, suggesting post-transcriptional regulation. Indeed, after a 7h30 stimulation, IL-33 increased the CysLT1 transcript 1/transcript 4 ratio. Moreover, proteasomal and lysosomal inhibitors did not block IL-33-induced CysLT1 expression, suggesting a regulation of mRNA alternative splicing or transcript stability. Thus, this work contributes to broaden the knowledge on the immune mechanisms potentially involved in asthma pathogenesis. In addition, new perspectives are provided for the study of IL-33 and CysLT1.

Keywords: Interleukin-33, CysLT1, cysteinyl-leukotrienes, lymphocytes, asthma, alternative splicing

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|------------|
| Résumé..... | i |
| Summary | ii |
| Table des matières | iii |
| Liste des tableaux..... | vi |
| Liste des figures..... | vii |
| Liste des abréviations | ix |
| Remerciements..... | xi |
| Introduction..... | 1 |
| 1. L’asthme..... | 1 |
| 1.1. Définitions de l’asthme..... | 1 |
| 1.1.1.Profils cliniques..... | 1 |
| 1.1.2.Profils histologiques..... | 1 |
| 1.1.3.Profils inflammatoires..... | 2 |
| 1.1.4.Plusieurs endotypes..... | 2 |
| 1.2. Ontogénèse de l’asthme..... | 3 |
| 1.3. Immunopathologie de l’asthme | 4 |
| 1.3.1. La barrière épithéliale bronchique : du maintien de l’homéostasie à l’initiation de la réponse inflammatoire | 4 |
| 1.3.2. Recrutement du système immunitaire adaptatif..... | 6 |
| 1.3.3. De la réponse inflammatoire à la crise d’asthme..... | 10 |
| 1.3.4. Remodelage bronchique | 10 |
| 1.4. Traitements actuels et enjeux..... | 11 |
| 2. L’Interleukine-33 | 13 |
| 2.1. Caractérisation | 13 |
| 2.2. Profil d’expression de l’IL-33 | 14 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 2.3. | L'IL-33 comme facteur nucléaire..... | 15 |
| 2.3.1. | Condensation de la chromatine..... | 15 |
| 2.3.2. | Interactions avec la voie NF- κ B..... | 16 |
| 2.4. | L'IL-33 comme cytokine..... | 16 |
| 2.4.1. | Le récepteur ST2..... | 16 |
| 2.4.2. | Régulation de l'activité cytokinique de l'IL-33..... | 22 |
| 2.4.3. | Rôles de l'IL-33 dans la régulation de l'inflammation..... | 23 |
| 2.5. | Rôle de l'IL-33 dans l'asthme..... | 25 |
| 3. | Les cystéinyl-leucotriènes..... | 26 |
| 3.1. | Métabolisme des cystéinyl-leucotriènes..... | 26 |
| 3.2. | Régulation de la production des cysLTs..... | 27 |
| 3.3. | Les récepteurs aux cysLTs..... | 29 |
| 3.3.1. | CysLT1..... | 29 |
| 3.3.2. | CysLT2..... | 32 |
| 3.3.3. | GPR99..... | 33 |
| 3.4. | CysLTs et asthme..... | 34 |
| 3.4.1. | Rôle des cysLTs dans la pathogenèse de l'asthme..... | 34 |
| 3.4.2. | Rôle des récepteurs CysLT1 et CysLT2 dans l'asthme..... | 36 |
| 4. | Hypothèse et objectifs..... | 38 |
| | Chapitre 1..... | 39 |
| | L'IL-33 augmente l'expression du récepteur de type 1 des cystéinyl-leucotriènes dans les lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique humain..... | 39 |
| | Chapitre 2..... | 74 |
| | Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du récepteur de type 1 des cystéinyl-leucotriènes par l'IL-33..... | 74 |
| | Discussion..... | 100 |
| 1. | Régulation post-transcriptionnelle de CysLT1 par l'IL-33..... | 100 |

| | |
|--|------------|
| 1.1. Régulation post-transcriptionnelle de CysLT1 | 100 |
| 1.1.1. L'IL-33 augmente-t-elle la traduction du récepteur CysLT1 ?..... | 100 |
| 1.1.2. Comment l'IL-33 régule-t-elle les niveaux d'expression des transcrits 1 et 4 ?..... | 100 |
| 1.1.3. Comment l'altération du ratio transcrit 1/4 peut-elle affecter la traduction de CysLT1 ?..... | 102 |
| 1.2. Signalisation du récepteur ST2L | 103 |
| 1.2.1. Comment l'IL-33 active-t-elle mTOR ? | 103 |
| 1.2.2. Comment TAK-1 et mTORC1 peuvent-ils réguler la traduction de CysLT1 ?..... | 104 |
| 1.3. Sous-populations lymphocytaires..... | 105 |
| 2. Sensibilité des cellules T naïves à l'IL-33 | 105 |
| 2.1. Expression de ST2L..... | 105 |
| 2.2. Pertinence | 106 |
| 3. Collaboration de l'IL-33 et des cysLTs dans l'asthme..... | 107 |
| 3.1. Recrutement et activation des lymphocytes T <i>in situ</i> | 107 |
| 3.2. Polarisation de la réponse inflammatoire | 107 |
| 3.3. Rôle des lymphocytes T ST2 ⁺ dans l'asthme | 108 |
| 3.4. Perspectives | 110 |
| 3.4.1. Confirmation du modèle <i>in vivo</i> | 110 |
| 3.4.2. Donneurs allergiques et/ou asthmatiques..... | 110 |
| 3.4.3. Rôles de CysLT1 dans les lymphocytes T CD8 ⁺ , NK et B..... | 111 |
| 3.4.4. Application à d'autres types cellulaires | 111 |
| 4. Pertinence pour d'autres contextes inflammatoires..... | 112 |
| Conclusion | 114 |
| Références..... | 115 |
| Annexes | 141 |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Séquences des amorces utilisées pour amplifier les transcrits de GAPDH et CysLT1. | 81 |
| Tableau 2. Analyse <i>in silico</i> des sites de liaison de RBPs au sein de l'exon 2 de CYSLT 85 | |
| Tableau 3. Analyse <i>in silico</i> des sites de liaison de RBPs au sein de l'exon 3 de CYSLT1..... | 86 |

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| Figure 1. Structure de l'IL-33 et sites de clivages | 14 |
| Figure 2. Les isoformes du récepteur ST2 | 17 |
| Figure 3. Signalisation du récepteur ST2L | 21 |
| Figure 4. Synthèse des cystéinyl-leucotriènes à partir de l'acide arachidonique | 27 |
| Figure 5. Les transcrits alternatifs de CysLT1 | 30 |

CHAPITRE 1

| | |
|---|----|
| Figure 1. CysLT1 and CysLT2 mRNA and protein expression in human peripheral blood lymphocytes stimulated with IL-33 | 51 |
| Figure 2. Involvement of ST2L in IL-33-induced expression of CysLT1 | 51 |
| Figure 3. Involvement of mTOR and TAK-1 pathways in IL-33-induced expression of CysLT1 | 52 |
| Figure 4. Modulation of CysLT1 expression in lymphocyte sub-populations after IL-33 stimulation | 54 |
| Figure 5. Modulation of LTD ₄ -induced intracellular calcium mobilisation by IL-33 in lymphocytes | 55 |
| Figure 6. Modulation of LTD ₄ -induced T lymphocyte migration by IL-33 | 57 |
| Figure 7. Modulation of LTD ₄ -induced calcium influx and migration in T lymphocytes after a 24h-treatment with IL-33 | 58 |
| Figure 8. Modulation of CysLT1 expression by IL-33 in enriched CD4 ⁺ T cells | 59 |
| Figure 9. Modulation of CysLT1 expression by IL-33 in naïve and memory CD4 ⁺ T lymphocytes | 61 |
| Figure 10. ST2L expression in naïve CD4 ⁺ T lymphocytes | 62 |

CHAPITRE 2

| | |
|---|----|
| Figure 1. Modulation des niveaux de transcrits alternatifs de CysLT1 par l'IL-33 dans les lymphocytes du sang périphérique humain | 83 |
| Figure 2. Modulation de l'expression de CysLT1 par l'actinomycine D et le cycloheximide | 87 |
| Figure 3. Régulation de l'expression de CysLT1 par ARN interférant | 89 |
| Figure 4. Modulation par les inhibiteurs des voies de dégradation protéasomales et lysosomales de l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33 | 90 |

DISCUSSION

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Coopération de l'IL-33 et des cysLTs dans le recrutement et l'activation des lymphocytes T du sang périphérique humain | 109 |
|---|-----|

ANNEXES

| | |
|---|-----|
| Figure S1. Gating strategy for analysis of CysLT1 expression in lymphocyte populations | 141 |
| Figure S2. Modulation of CysLT1 expression in CD8 ⁺ T cells after IL-33 stimulation .. | 142 |
| Figure S3. Modulation of CysLT1 expression and LTD ₄ -induced calcium influx by IL-33 in B and NK cells..... | 143 |
| Figure S4. IL-33-induced CysLT1 upregulation in non-permeabilized CD3 ⁺ cells..... | 144 |
| Figure S5. Gating strategy for analysis of LTD ₄ -induced calcium mobilisation in lymphocyte populations..... | 145 |
| Figure S6. Modulation of LTC ₄ -, LTE ₄ - and SDF-1-induced calcium influx by IL-33 in CD3 ⁺ cells..... | 146 |
| Figure S7. Gating strategy for analysis of LTD ₄ -induced chemotaxis in lymphocyte populations..... | 147 |
| Figure S8. Purity of enriched CD4 ⁺ cells..... | 148 |
| Figure S9. Gating strategy for analysis of LTD ₄ -induced chemotaxis in CD4 ⁺ CD45RA ⁺ and CD4 ⁺ CD45RO ⁺ lymphocytes | 149 |
| Figure S10. Purity of purified CD45RA ⁺ cells | 150 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-----------|---|
| aa | acides aminés |
| AP-1 | <i>Activator Protein-1</i> |
| APC | <i>Antigen-Presenting Cell</i> |
| iBALT | <i>inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i> |
| CaMKII | <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i> |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| C(X)CL | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> |
| C(X)CR | <i>C-(X)-C motif Chemokine Receptor</i> |
| DCs | <i>Dendritic cells/Cellules dendritiques</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase</i> |
| FcεR | <i>Fc epsilon Receptor</i> |
| FLAP | <i>Five-Lipoxygenase-Activating Protein</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> |
| GSK3β | <i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i> |
| eIF | <i>eukaryote Initiation Factor (of translation)</i> |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| IL-1RAcP | <i>IL-1 Receptor Accessory Protein</i> |
| ILCs | <i>Innate Lymphoid cells</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| IRAK-1/-4 | <i>IL-1 Receptor-Associated Kinase-1/-4</i> |
| 5-LO | <i>5-Lipoxygenase</i> |
| LT | <i>leukotriene</i> |
| cysLTs | <i>cysteinyl-leukotrienes</i> |
| MAPKs | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> |
| MCP-1 | <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> |
| MIP-1 | <i>Macrophage inflammatory protein 1</i> |
| MMP | <i>Matrix metalloproteinase</i> |
| MNK1 | <i>MAPK interacting protein kinase 1</i> |
| Myd88 | <i>Myeloid differentiation primary response 88</i> |
| NF-HEV | <i>Nuclear factor of high endothelial venules</i> |
| NFAT | <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NFκB | <i>Nuclear factor kappa B</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| iNKT | <i>innate Natural Killer T (cells)</i> |
| PAF | <i>Platelet activating factor</i> |
| PAMPs | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PARs | <i>Protease activated receptors</i> |
| PG | Prostaglandine |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |

| | |
|----------------|---|
| PKA | Protéine kinase A |
| PKC | Protéine kinase C |
| cPLA2 | Phospholipase A ₂ cytosolique |
| PRRs | Pattern recognition receptors |
| RBP | <i>RNA-Binding proteins</i> |
| siRNA | <i>small interfering ribonucleic acid</i> |
| RSV | <i>respiratory syncytial virus</i> |
| S6K1 | <i>S6 kinase 1</i> |
| ST2 | <i>Suppression of tumorigenicity 2</i> |
| STAT | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| TAK-1 | <i>TGFb-activated kinase</i> |
| TCR | <i>T-cell receptor</i> |
| TGFb | <i>Transforming growth factor</i> |
| TIR | <i>Toll-Interleukin Receptor</i> |
| cellules Th/Tc | cellules T auxiliaires (<i>helper</i>) / cytotoxiques |
| TLR | <i>Toll-Like Receptor</i> |
| TNFa | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| TRAF-6 | <i>TNF Receptor associated factor</i> |
| TSLP | <i>Thymic stromal lymphopoietin</i> |

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit d'un travail et d'une formation de plusieurs années qui n'aurait pas été possible sans le soutien, les conseils et les encouragements de nombreuses personnes que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces cinq années.

Je remercie Pr Marek Rola-Pleszczynski et Pre Jana Stankova, de m'avoir fait confiance dès le début, de m'avoir laissée avancer à mon rythme, dans les directions qui m'intéressaient, de m'avoir laissée me tromper et surtout de toujours m'avoir encouragée dans les réussites comme dans les échecs.

Je remercie Pr Abdelaziz Amrani, Pre Nancy Dumais et Pr Paul-Henri Naccache d'avoir évalué mon travail. Je remercie aussi Pr Abdelaziz Amrani et Pre Nancy Dumais pour l'intérêt qu'ils y ont porté depuis le début, leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie Sylvie Turcotte pour son soutien technique et sa bonne humeur sans lesquels ce travail aurait été plus long et fastidieux.

Je remercie Leonid Volkov et les professeurs du programme d'immunologie pour leurs conseils, leur disponibilité (et parfois aussi pour leur matériel).

Le doctorat est aussi une aventure humaine où l'on apprend quelque chose de nouveau, de mieux ou de différent à chaque rencontre. Pour toutes ces choses qui font d'un laboratoire sans fenêtre un environnement de travail plein de lumière(s), je remercie Fanny, Sylvie, Geneviève, Gregory, Louiza, Sarah, Daniel, Steeve, Jean-François, Maryse, ainsi que les étudiants du programme d'immunologie.

Je remercie Vincent Normant de m'avoir accompagnée dans ce parcours sinueux et semé d'embûches. Je le remercie pour ses conseils tant personnels que professionnels.

Finalement, je souhaite remercier ma famille qui, malgré la distance, est toujours restée présente. Je remercie particulièrement mes parents qui m'ont toujours encouragée à faire ce que j'aime, et qui m'ont appris à le faire avec ouverture, curiosité, rigueur, persévérance et intégrité.

INTRODUCTION

1. L'ASTHME

1.1. Définitions de l'asthme

L'asthme est la maladie inflammatoire chronique pulmonaire la plus répandue, affectant près de 300 millions de personnes dans le monde, soit 1 à 18% de la population selon les pays (Becker et Abrams, 2017; Reddel *et al.*, 2015). La dernière définition émise par le programme GINA (*Global Initiative for Asthma*) décrit l'asthme comme une « maladie hétérogène, caractérisée par une obstruction réversible des bronches et une inflammation chronique des voies respiratoires » (Becker et Abrams, 2017; Reddel *et al.*, 2015).

1.1.1. Profils cliniques

L'asthme est défini par un « historique de symptômes respiratoires tels que des sifflements, un souffle court, une sensation d'oppression de la cage thoracique, de la toux et/ou une limitation de la capacité expiratoire, dont la fréquence et l'intensité varient dans le temps » (Becker et Abrams, 2017; Reddel *et al.*, 2015). La fréquence et l'intensité des symptômes permettent de distinguer des profils cliniques allant de l'asthme léger à l'asthme sévère. Les formes plus légères d'asthme se présentent généralement sous forme d'exacerbations des symptômes, ou crises d'asthmes, temporaires et réversibles en absence de médication. Au contraire, les formes les plus sévères peuvent être réfractaires aux traitements et présenter des déficiences respiratoires chroniques. Les crises d'asthme peuvent être provoquées ou amplifiées par une grande diversité de stimuli dont les principaux décrits sont les allergènes, les virus et autres agents infectieux, les substances chimiques irritantes, l'exercice physique, ainsi que l'aspirine et ses dérivés (Becker et Abrams, 2017; Reddel *et al.*, 2015).

1.1.2. Profils histologiques

Au niveau histologique, le poumon asthmatique est caractérisé par une hyperplasie épithéliale avec production de mucus, un épaississement de la membrane basale, une fibrose du tissu interstitiel sous-épithélial, une hyperplasie et/ou hypertrophie des muscles lisses et de la néo-angiogenèse (Sumi et Hamid, 2007; Tagaya et Tamaoki, 2007). Ces paramètres typiques de l'hyperréactivité et du remodelage bronchique participent à l'épaississement et

à la rigidification de la paroi bronchique, diminuant les capacités respiratoires et causant les symptômes respiratoires précités.

1.1.3. Profils inflammatoires

L'asthme est aussi une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une infiltration leucocytaire dans la muqueuse pulmonaire. Les cellules du système immunitaire sont recrutées en réponse aux stimuli initiateurs de la crise d'asthme et par les dommages tissulaires associés, et joue un rôle clé dans le développement des symptômes asthmatiques (Gauvreau *et al.*, 2015; Russell et Brightling, 2017). Bien que la réponse inflammatoire asthmatique a longtemps été considérée de type 2, plusieurs profils inflammatoires sont maintenant reconnus et la plupart des classifications distingue les asthmes à fort profil de type 2 et les asthmes à faible profil de type 2. L'inflammation de type 2 est caractérisée par une infiltration éosinophilique de la muqueuse pulmonaire, l'activation des lymphocytes T auxiliaires (Th)2 et des concentrations élevées en cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et immunoglobulines (Ig)E dans le tissu pulmonaire ou dans le liquide bronchoalvéolaire. Au contraire, les asthmes à faibles profils de type 2 peuvent présenter de l'inflammation de type 1 ou mixte, avec activation des lymphocytes Th1 et Th17, et production d'interféron (IFN) γ et IL-17, et peuvent être pauci-granulocytaires ou neutrophiliques (Loo et Wark, 2016; Russell et Brightling, 2017).

1.1.4. Plusieurs endotypes

Considérant l'hétérogénéité des profils inflammatoires, des réponses aux traitements, de la sévérité des symptômes, de l'âge d'apparition de la maladie, ainsi que la diversité des stimuli initiateurs des crises d'asthmes, plusieurs sous-types cliniques de la maladie, ou endotypes, ont été proposés (Borish, 2016; Guilleminault *et al.*, 2017; Reddel *et al.*, 2015; Xie et Wenzel, 2013). Parmi les endotypes les plus fréquemment cités, on retrouve notamment :

- L'asthme allergique, à fort profil inflammatoire de type 2, qui se déclare généralement dans l'enfance ;
- L'asthme éosinophilique tardif, à profil inflammatoire de type 2, qui apparaît chez l'adulte et présente un profil allergique moindre ;
- L'asthme induit par l'aspirine (AERD/*Aspirin exacerbated airway disease*), qui est parfois proposé comme un sous-endotype d'asthme éosinophilique tardif ;

- L'asthme à l'effort induit par l'activité physique, généralement à profil de type 2 ;
- L'asthme neutrophilique ;
- L'asthme associé à l'obésité, qui touche plus souvent les femmes adultes ;
- L'asthme avec limitations respiratoires permanentes dues à un remodelage bronchique intense ou un défaut de physiologie pulmonaire (défaut de développement) et qui peut s'apparenter à la maladie obstructive pulmonaire chronique (ACOS/*Asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome*).

Les classifications des endotypes asthmatiques peuvent différer selon le nombre de critères considérés et n'excluent pas la possibilité d'une évolution de la maladie d'un endotype vers un autre.

1.2. Ontogénèse de l'asthme

L'asthme est une maladie multifactorielle découlant de l'interaction entre des facteurs de prédisposition génétiques et environnementaux (Bonnelykke et Ober, 2016; Rava *et al.*, 2015; Toskala et Kennedy, 2015).

Appuyant la définition de l'asthme comme une maladie inflammatoire, les polymorphismes majeurs prédisposants à l'asthme sont localisés dans des gènes généralement associés à l'immunité tels que les gènes *HLA*, *TSLP*, *IL33*, *IL1RL1*, *RORA*, *GATA3*, *SMAD3*, *GSTP1* (Ober, 2016). Parmi les facteurs environnementaux, les plus cités sont la pollution, le tabagisme, les microbes, les substances irritantes et l'obésité (Toskala et Kennedy, 2015). Des études d'interaction (*Genom-wide interaction studies*) ont révélé l'importance de différents facteurs génétiques et environnementaux dans le développement de l'asthme selon les endotypes (Bonnelykke et Ober, 2016; Rava *et al.*, 2015). Ainsi, les gènes *IL33* et *IL1RL1* sont plus associés à l'asthme allergique (Lavoie-Charland *et al.*, 2016), alors que des polymorphismes dans les gènes impliqués dans la neutralisation des espèces réactives à l'oxygène (*GSTP1*) augmentent le risque de développer l'asthme associé à la pollution (Rava *et al.*, 2015).

L'atopie, définie par la propension à produire des IgE, est un profil familial prédisposant au développement d'allergies, dont l'asthme allergique (Just, 2013). La marche atopique est caractérisée par l'occurrence successive de dermatite atopique chez le nourrisson, des allergies alimentaires dans l'enfance puis de l'asthme qui peut persister en rhinite à l'âge adulte. L'augmentation importante de la prévalence des maladies allergiques,

dont l'asthme, au cours des 50 dernières années est partiellement expliquée par « l'hypothèse hygiéniste » (Bloomfield *et al.*, 2016; Lambrecht et Hammad, 2017). Celle-ci propose que la démocratisation des mesures d'hygiène au cours du XXe siècle qui a permis une diminution de la prévalence des maladies infectieuses dans les pays industrialisés, a aussi conduit à une réduction de la diversité microbienne rencontrée dans la petite enfance et un biais d'éducation du système immunitaire favorisant l'immunité de type 2 (Bloomfield *et al.*, 2016; Lambrecht et Hammad, 2017). Dernièrement, de plus en plus d'études confirment qu'un ralentissement de la diversification du microbiome intestinal au cours de la période post-natale augmente les risques de développer des allergies (Reynolds et Finlay, 2017; Stiemsma et Turvey, 2017). La régulation du système immunitaire par le microbiome intestinal et par l'alimentation a ainsi été démontrée comme facteur d'influence dans le développement de l'asthme allergique (McAleer et Kolls, 2018; Stiemsma et Turvey, 2017).

1.3. Immunopathologie de l'asthme

1.3.1. La barrière épithéliale bronchique : du maintien de l'homéostasie à l'initiation de la réponse inflammatoire

1.3.1.1. La muqueuse bronchique

L'épithélium bronchique constitue une barrière physique et chimique entre le tissu pulmonaire et la lumière bronchique, où circule l'air inspiré. Cette barrière consiste en une monocouche de cellules épithéliales étroitement jointes par des jonctions serrées (occludines, claudines) et adhérentes (E-cadhérine) qui permettent le contrôle de la perméabilité membranaire et le maintien de la polarité apico-basale (Gon et Hashimoto, 2018; Loxham *et al.*, 2014). L'épithélium sécrète divers peptides anti-microbiens dans la lumière bronchique, contrôlant la composition du microbiome bronchique et constituant une première ligne de défense contre les infections. Dans l'espace sous-épithélial, le tissu conjonctif maintient l'architecture de la muqueuse, et les glandes à mucus, les muscles lisses, ainsi que les capillaires sanguins assurent le bon fonctionnement pulmonaire. Enfin, les cellules immunitaires résidentes (macrophages, cellules dendritiques – DCs, cellules lymphoïdes innées – ILCs, lymphocytes mémoires) ou infiltrantes (DCs et monocytes) échantillonnent la composition de l'espace bronchique et sont prêtes à répondre rapidement face aux infections et dommages potentiels (Lloyd et Marsland, 2017).

1.3.1.2. Détection des signaux de danger

Les cellules épithéliales bronchiques, ainsi que la plupart des cellules de la muqueuse bronchique ont la capacité de détecter des signaux de danger (agents infectieux ou substances toxiques) via plusieurs types de récepteurs tels que les PRRs (*Pattern recognition receptors*), les récepteurs aux lectines de type C (*C-type lectin receptors*) et les PARs (*Protease activated receptors*) (Lambrecht et Hammad, 2014; Salazar et Ghaemmaghani, 2013).

La plupart des PRRs a été étudiée dans des contextes d'immunité antimicrobienne de type Th1 pour leur capacité à lier des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns). Néanmoins, certains virus et allergènes activent aussi l'immunité de type 2 via ces récepteurs (Lambrecht et Hammad, 2014; Salazar et Ghaemmaghani, 2013). Ainsi, le TLR (*Toll-like receptor*)-4 peut participer à l'établissement de l'immunité Th2 dans certains modèles murins d'hypersensibilité induite par les acariens (Hammad *et al.*, 2009; Lambrecht et Hammad, 2014).

Les récepteurs des immunoglobulines exprimés par les cellules immunes permettent à celles-ci de détecter les complexes immuns et initier la réponse inflammatoire adéquate. Les IgE, particulièrement abondantes chez les patients atopiques ou atteints d'asthme allergique, initient rapidement la réponse asthmatique lorsqu'elles lient leurs antigènes spécifiques et leurs récepteurs de haute affinité (FcεRI) à la surface des mastocytes, basophiles et DCs (Platts-Mills, 2001; Salazar et Ghaemmaghani, 2013).

De nombreux allergènes, tels que Der p 1 dérivé des acariens, sont dotés d'activité protéolytique pouvant activer directement les récepteurs PAR-1 et PAR-2 à la surface des cellules immunitaires et épithéliales (Lambrecht et Hammad, 2014; Salazar et Ghaemmaghani, 2013). Cette activité protéolytique peut aussi cibler les jonctions intercellulaires épithéliales, augmentant la perméabilité de la barrière épithéliale et favorisant la détection des signaux de danger et la capture des antigènes par les cellules immunitaires (Salazar et Ghaemmaghani, 2013).

1.3.1.3. Initiation de la réponse inflammatoire

Dans la muqueuse bronchique saine, l'IL-10 produite par les cellules épithéliales et immunitaires résidentes inhibe l'activation des cellules immunitaires sentinelles (Lloyd et Marsland, 2017). L'expression d'IL-10 et de l'E-cadhérine par les cellules épithéliales bloque la maturation des cellules dendritiques, permettant d'induire une tolérance immune

face aux antigènes alimentaires ou environnementaux inhalés (Hammad et Lambrecht, 2015; Lloyd et Marsland, 2017). Au contraire, la détection de signaux de danger induit rapidement la production de chimiokines, alarmines et cytokines induisant l'infiltration et l'activation des cellules du système immunitaire (Iwasaki *et al.*, 2017).

Les chimiokines CCL17, CCL22 et la prostaglandine D2 ainsi que leurs récepteurs respectifs, CCR4, CCR3 et CRTH2, permettent le recrutement rapide de DCs, ILC2s, basophiles, mastocytes, éosinophiles et lymphocytes Th2 dans le tissu pulmonaire enflammé (Hammad et Lambrecht, 2015; Xue *et al.*, 2014). À leur tour, les cellules recrutées et activées produisent aussi ces chimiokines, amplifiant l'infiltration leucocytaire (Hammad et Lambrecht, 2015).

Les alarmines telles que l'IL-33, l'IL-1 α et HMGB1 (High Mobility Group Box 1), l'acide urique et l'ATP sont exprimés de façon constitutive par les cellules épithéliales. Libérés en réponse à un dommage cellulaire, une nécrose ou des signaux de danger (PAMPs ou allergènes), ils permettent de recruter et activer le système immunitaire dans le but d'éliminer la source de danger détectée (Hammad et Lambrecht, 2015; Ramu *et al.*, 2018).

Les cytokines épithéliales, IL-25, IL-33 et TSLP (lymphopoïétine stromale thymique), ont été caractérisées plus récemment comme étant à la base du processus de polarisation de la réponse inflammatoire de type 2 au niveau des muqueuses. Leur production est initiée ou amplifiée par la perte d'intégrité épithéliale et les alarmines (Kool *et al.*, 2011; Mitchell et O'Byrne, 2017; Willart *et al.*, 2012). Bien que ces cytokines appartiennent à différentes familles de cytokines, ne partagent pas d'homologie de séquence et lient des récepteurs différents, elles présentent des fonctions souvent redondantes et agissent en synergie pour activer directement les ILC2s, basophiles, mastocytes et éosinophiles, ainsi que les DCs, conduisant à la différenciation des lymphocytes Th2 (Hammad et Lambrecht, 2015; Mitchell et O'Byrne, 2017). Les cellules épithéliales sont aussi une source importante de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) qui stimule la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes, DCs et macrophages, et facilite la réponse allergique (Bleck *et al.*, 2006; Llop-Guevara *et al.*, 2014).

1.3.2. Recrutement du système immunitaire adaptatif

Les cellules dendritiques, ILC2s et basophiles activés par les PAMPs, alarmines et cytokines épithéliales collaborent pour activer et recruter le système immunitaire adaptatif

(Hammad et Lambrecht, 2015). Ce dernier est composé des lymphocytes T et B qui grâce à leurs récepteurs TCR (*T-cell receptor*) et BCR (*B-cell receptor*), respectivement, peuvent monter une réponse immune spécifique contre les antigènes capturés au site de l'inflammation. Cette réponse immune est aussi caractérisée par l'acquisition d'une mémoire immunitaire. Ainsi, les lymphocytes T et B mémoires sont activés plus rapidement et en réponse à des doses plus faibles d'antigènes à chaque nouvelle exposition (Lloyd et Harker, 2016).

1.3.2.1. Activation des lymphocytes T

Le système immunitaire adaptatif, spécifique de l'antigène, est particulièrement connu dans l'asthme allergique, où l'allergène est l'antigène contre lequel la réponse est montée. Dans ce contexte, la réponse développée est caractérisée par un fort profil Th2 et la production d'IgE par les lymphocytes B. Dans les asthmes non allergiques, malgré l'absence d'antigène connu, les lymphocytes T sont aussi mobilisés, et peuvent être activés dans des profils plus variés modulant différemment la réponse inflammatoire et la réponse aux traitements (Moldaver *et al.*, 2017; Muehling *et al.*, 2017).

1.3.2.1.1.1. Activation des cellules Th2 par les DCs dans le contexte asthmatique

Bien que les lymphocytes T ne soient pas plus abondants dans le lavage broncho-alvéolaire de patients asthmatiques que non asthmatiques, ils y sont plus activés, préférentiellement dans un phénotype Th2 (Virchow *et al.*, 1995). De plus, leur rôle pathogénique a été démontré dans plusieurs modèles animaux, dans lesquels la déplétion des cellules T CD4⁺ diminue l'inflammation bronchique (Doherty *et al.*, 2009), alors que le transfert adoptif de lymphocytes Th2 sensibilise l'animal (Cohn *et al.*, 1997). De même, les cellules dendritiques, responsables de l'activation des lymphocytes par la présentation antigénique, ont été montrées comme nécessaires et suffisantes pour induire la réponse cellulaire Th2 dans un modèle murin d'hypersensibilité aux poussières (Hammad *et al.*, 2010; Lambrecht *et al.*, 1998).

L'activation des cellules Th2 par les DCs dans un contexte d'hyperréactivité bronchique implique plusieurs signaux cellulaires et cytokiniques : les interactions CMH/TCR, les signaux de costimulation OX40L/OX40, et les cytokines IL-4/IL13 (Vroman *et al.*, 2015).

L'activation des lymphocytes T naïfs par les cellules présentatrices d'antigène (APC) est un processus dépendant de la spécificité antigénique. Cette spécificité provient de l'affinité de l'antigène pour la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) via laquelle l'antigène est présenté par l'APC et pour le récepteur TCR exprimé par le lymphocyte T. La force de ces interactions, ainsi que les signaux transduits par les molécules de costimulation, permettent d'atteindre le seuil d'activation des cellules T et induisent leur expansion clonale. De cette prolifération, sont issues des cellules T effectrices et, à plus long terme, des cellules T mémoires. Le profil immun de ces cellules T activées est défini par les molécules de costimulation engagées et les cytokines perçues par la cellule T au moment de la présentation antigénique.

Les cytokines épithéliales et les récepteurs de capture ou de détection des antigènes (MRC-1, FcεRI, Dectin-1) induisent la maturation des DCs en augmentant l'expression des molécules de costimulation telles que CD80/CD86 et OX40L (Ito *et al.*, 2017; Kaur et Brightling, 2012). L'expression de OX40L est augmentée à la surface des DCs de patients asthmatiques, et sa liaison au récepteur OX40, à la surface des cellules T, est impliquée dans la polarisation des lymphocytes Th2 dans différents modèles d'asthme (Kaur et Brightling, 2012).

Enfin, les fonctions effectrices des lymphocytes Th2 sont acquises en présence de cytokines de type II, principalement l'IL-4 ou l'IL-13, dépendamment du modèle d'étude. Dans un modèle de sensibilisation à l'ovalbumine, les basophiles constituent la source majeure d'IL-4 (Zhong *et al.*, 2014). En revanche, dans un modèle de sensibilisation intranasale à la papaïne, l'IL-13 produit par les ILC2s est nécessaire à la polarisation de la réponse immune (Halim *et al.*, 2014). Plus récemment, l'IL-33 a été identifiée comme un signal tissulaire de différenciation terminale des lymphocytes Th2 IL-5⁺ qui ont été préalablement activés au ganglion lymphatique (Van Dyken *et al.*, 2016).

1.3.2.1.1.2. Autres profils de polarisation des lymphocytes Th dans l'asthme

Les différents profils de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ sont définis par la production de cytokines clés. Ainsi, on distingue les Th1 (IFNγ⁺), les Th2 (IL-4⁺ IL-5⁺ IL-13⁺), les Th17 (IL-17⁺), les Th9 (IL9⁺) et les Th22 (IL-22⁺). Bien que l'asthme soit considéré comme une maladie inflammatoire à profil de type 2, il est maintenant admis que les autres populations de Th participent aussi à la pathogenèse dans des proportions différentes

dépendamment des endotypes de la maladie (Moldaver *et al.*, 2017; Muehling *et al.*, 2017). L'expression des différentes cytokines spécifiques de chaque profil de polarisation n'est cependant pas exclusive et les lymphocytes Th sont sujets à une certaine plasticité influencée par l'environnement inflammatoire à chaque crise d'asthme ou par les traitements administrés (Muehling *et al.*, 2017). À l'inverse, la signature immune dictée par les cellules Th influence la sévérité de la pathologie et la réponse aux traitements. Ainsi, l'abondance des lymphocytes Th1-Th17 et la production d'IFN γ , sont associées à certaines formes sévères de l'asthme (Hammad et Lambrecht, 2015; Krug *et al.*, 1996; Raundhal *et al.*, 2015). De plus, le transfert adoptif de lymphocytes Th1 dans des souris sensibilisées à l'ovalbumine réduit l'éosinophilie et la production de mucus mais ne réduit pas l'hyperréactivité bronchique et induit une inflammation sévère du tissu pulmonaire (Hansen *et al.*, 1999). Enfin, le transfert adoptif de lymphocytes Th17 peut favoriser la neutrophilie et la résistance aux glucocorticoïdes (McKinley *et al.*, 2008).

1.3.2.1.2. Activation des lymphocytes B

Sous l'influence des cytokines IL-4/IL-13, et l'interaction CD40/CD40L avec les lymphocytes folliculaires Th2, les lymphocytes B naïfs se différencient en cellules plasmacytoïdes productrices d'IgE (Dullaers *et al.*, 2012). Cette production est particulièrement importante dans les asthmes allergiques ou à fort profil Th2. Les IgE ainsi produites sont reconnues et fixées par leurs récepteurs de haute affinité à la surface des mastocytes et basophiles, qui pourront être activés en présence de l'antigène spécifique.

Indépendamment de leur récepteur spécifique d'antigène (BCR), les lymphocytes B sont aussi capables de capturer et présenter efficacement les antigènes pour activer les lymphocytes Th2 (Drake *et al.*, 2015; Wypych *et al.*, 2018).

1.3.2.2. Localisation de la réponse immune adaptative dans l'asthme

Au cours de leur maturation, les cellules dendritiques acquièrent l'expression de CCR7, leur permettant de migrer aux ganglions lymphatiques drainant les poumons, en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 produites de façon constitutive au niveau des zones T ganglionnaires, où les DCs peuvent activer les lymphocytes T naïfs. Les modèles murins déficients en CCL19, CCL21 ou CCR7 ont révélé l'importance de la migration des DCs au ganglion lymphatique dans l'initiation et la résolution de la réaction

d'hypersensibilité aux poussières (Kawakami *et al.*, 2012; Plantinga *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2006).

L'activation des lymphocytes T et B peut aussi être locale, au niveau des organes lymphoïdes tertiaires associés aux muqueuses. Les iBALT (*inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissues*) sont des structures composées de DCs, lymphocytes T et B, plus ou moins organisées, situées dans la sous-muqueuse pulmonaire (Elliot *et al.*, 2004). Elles sont induites en réponse aux infections ou inflammations répétitives, et de cette façon, sont très présentes dans les poumons d'individus asthmatiques (Elliot *et al.*, 2004). Ces structures permettent l'activation *in situ* des lymphocytes T et B mémoires résidents et des lymphocytes naïfs infiltrant le tissu enflammé (Shinoda *et al.*, 2017).

1.3.3. De la réponse inflammatoire à la crise d'asthme

Dès la mobilisation du système immunitaire inné, localement (mastocytes, basophiles, DCs, ILC2s), l'environnement inflammatoire s'établit avec la production des cytokines de types 2 : IL-3, IL-4, IL-5, IL9, IL-13. Cette production est ensuite renforcée par l'activation des cellules Th2 et B. Ces cytokines conduisent au recrutement des éosinophiles (IL-5), au développement des mastocytes (IL-3 et IL-9) et à la production de mucus par l'épithélium (IL-13) (Gauvreau *et al.*, 2015).

Les cytokines de type 2, ainsi que le pontage des récepteurs FcεRI conséquemment à la liaison des antigènes aux IgE, induisent la dégranulation des mastocytes, basophiles et éosinophiles, et à la libération de médiateurs peptidiques (histamine) et lipidiques (leucotriènes et prostaglandines) qui agissent sur les muscles lisses pour provoquer la bronchoconstriction caractéristique de l'asthme (Gauvreau *et al.*, 2015).

1.3.4. Remodelage bronchique

Au cours de la réponse inflammatoire, diverses métalloprotéases (eg. MMP-9) sont sécrétées pour dégrader la matrice extracellulaire, favorisant l'infiltration leucocytaire et la déstructuration de la muqueuse bronchique (Wight *et al.*, 2017). Les cytokines et autres facteurs inflammatoires agissent sur les différents tissus de la muqueuse, conduisant à une perte d'intégrité de l'épithélium avec un épaississement de la membrane basale, une fibrose du tissu interstitiel sous-épithélial, une hyperplasie et/ou hypertrophie des muscles lisses et de la néo-angiogenèse (Sumi et Hamid, 2007; Tagaya et Tamaoki, 2007). Chez l'individu sain, ces caractéristiques sont typiques d'un remodelage bronchique physiologique,

consécutif à la résolution d'une réponse inflammatoire ou une infection aiguë. Chez l'individu asthmatique, la répétition des crises d'asthme et la chronicité de la réponse inflammatoire conduit à un remodelage pathologique avec perte des fonctions pulmonaires (Fehrenbach *et al.*, 2017).

1.4. Traitements actuels et enjeux

Plusieurs thérapies sont actuellement disponibles pour le traitement de l'asthme. Ces médications peuvent être administrées de façon intermittente ou chronique, sous forme topique par inhalation ou systémique par voie orale, selon la persistance et la sévérité des symptômes (Dunn *et al.*, 2017; McCracken *et al.*, 2017).

Étant donné l'importance du système immunitaire dans la pathogenèse, le choix thérapeutique de première intention pour l'asthme persistant est l'administration de corticostéroïdes, pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Dunn *et al.*, 2017; Vandevyver *et al.*, 2013). Au niveau clinique, les corticostéroïdes diminuent la récurrence des crises d'asthme, les symptômes asthmatiques, l'hypersensibilité bronchique, et améliorent la capacité respiratoire et la qualité de vie (Covar, 2016). De plus, ils préviennent les hospitalisations et les décès liés à l'asthme (Covar, 2016). En liant leur récepteur nucléaire, les corticostéroïdes modulent l'expression génique par divers modes d'action selon le gène cible et le type cellulaire (Vandevyver *et al.*, 2013). Ainsi, ils inhibent l'expression et l'action de plusieurs cytokines, chimiokines, enzymes et molécules d'adhésion impliquées dans la pathogenèse de l'asthme (Vandevyver *et al.*, 2013). Néanmoins, à cause de leur fort potentiel immunosuppresseur et parce que les récepteurs aux glucocorticoïdes ciblent de nombreux gènes dont les fonctions ne sont pas restreintes au processus inflammatoire, les corticostéroïdes peuvent induire divers effets secondaires tels que le ralentissement de la croissance chez l'enfant (Pruteanu *et al.*, 2014), une déminéralisation osseuse, des fractures ou de l'ostéoporose (Skoner, 2016), des infections fongiques (Fraczek *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2007). Par ailleurs, bien que les corticostéroïdes inhibent la prolifération de la plupart des cellules immunes, ils potentialisent la survie et l'activation des neutrophiles (Cox, 1995; Schleimer *et al.*, 1989). Ainsi, 75 à 80% des patients atteints d'asthme éosinophiliques répondent positivement aux corticostéroïdes contre 14 à 46% des patients atteints d'asthme non-éosinophilique, dépendamment du paramètre clinique observé (Borish, 2016; Cowan *et al.*, 2010).

Les agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques sont des bronchodilatateurs qui agissent directement sur les muscles lisses bronchiques (Crisafulli *et al.*, 2017). Alors que les agonistes à action courte sont généralement administrés pour gérer les crises d'asthme, les agonistes à action longue peuvent être prescrits en combinaison ou en substitut des corticostéroïdes (Dunn *et al.*, 2017; McCracken *et al.*, 2017). De même, les modulateurs de la voie des leucotriènes (inhibiteurs de synthèse et antagonistes du récepteur CysLT1) font partie des traitements alternatifs pour leur action bronchodilatatrice et anti-inflammatoires (Dunn *et al.*, 2017; Montuschi, 2010).

Les corticostéroïdes, les agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques et les modificateurs de la voie des leucotriènes ont démontré leur efficacité dans plusieurs études cliniques et sont les trois types de médication les plus utilisés dans le traitement de l'asthme (Becker et Abrams, 2017; Chikaodinaka Ayuk *et al.*, 2017). Cependant, la diversité génétique dans la population rend difficile de prédire leurs bénéfices thérapeutiques et leurs effets secondaires pour chaque individu (Gerber, 2016; Kersten et Koppelman, 2017).

Finalement, afin de cibler plus spécifiquement l'inflammation asthmatique, les anti-cytokiniques ont démontré une bonne efficacité à condition de les administrer aux patients présentant le profil inflammatoire correspondant (Borish, 2016; Dunn *et al.*, 2017). Ainsi, les anticorps anti-IL-5 sont plus efficaces chez les patients atteints d'asthme idiopathique éosinophilique, alors que les anti-IL-4 et IL-13 ont démontré une meilleure efficacité chez les patients allergiques (Borish, 2016).

Considérant donc la diversité des endotypes, des réponses aux traitements actuels et l'imprédictibilité de leurs effets secondaires, deux approches majeures sont actuellement en développement pour améliorer la thérapie de l'asthme : (1) caractériser les marqueurs de chaque endotype pour affiner le diagnostic et définir les marqueurs génétiques influençant la réponse aux traitements afin d'administrer le traitement disponible le mieux adapté pour chaque patient, et (2) caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques, plus en amont dans le processus inflammatoire afin de toucher plus largement les différents endotypes tout en restant spécifique de la pathologie pour limiter les effets secondaires. Parmi ces cibles potentielles, la cytokine épithéliale IL-33 a été récemment proposée et des traitements anti-IL-33 sont actuellement en essai clinique (Amgen, 2013).

2. L'INTERLEUKINE-33

2.1. Caractérisation

En 2003, Baekkevold *et al* ont caractérisé un nouveau gène humain à partir d'une banque d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) de HEVECs (*High Endothelial Venule Endothelial Cells* /cellules endothéliales des vénules à endothélium épais), situé au locus 9p24.1 et codant pour une protéine de 270 acides aminés (aa) et 30kDa. Du fait de la localisation nucléaire de la protéine encodée et de son association à la chromatine, les auteurs l'ont nommé NF-HEV pour '*Nuclear Factor from High Endothelial Venules*' (Baekkevold *et al.*, 2003). Deux ans plus tard, Schmitz *et al* identifiaient le ligand du récepteur ST2 (*Suppression of tumorigenicity 2*), récepteur orphelin déjà connu depuis 16 ans comme un récepteur de la famille IL-1 impliqué dans l'immunité de type 2 (Schmitz *et al.*, 2005). Le domaine C-terminal du ligand caractérisé présentant une forte homologie structurale avec les membre de la famille IL-1, les auteurs l'ont nommé IL-33 (Schmitz *et al.*, 2005). Baekkevold et Schmitz identifiaient aussi l'orthologue murin de l'IL-33/NF-HEV, une protéine de 266aa et 29,9kDa présentant 55% d'homologie de séquence avec la protéine humaine (Baekkevold *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2005). En 2007, Carrière *et al* associaient le facteur nucléaire et la cytokine comme étant une seule et même protéine à deux domaines fonctionnels (Carriere *et al.*, 2007). Dans les années suivantes, l'identification de sites de clivage entre les deux domaines fonctionnels ont permis de définir les 3 régions de l'IL-33 : un domaine nucléaire en position N-terminal lui conférant ses propriétés de liaison à la chromatine, un domaine cytokinique IL-1 en position C-terminal lui conférant sa capacité de liaison au récepteur ST2, et un domaine central porteur de plusieurs sites de clivages régulant son activité cytokinique (Figure 1) (Cayrol et Girard, 2018).

Cytokine de la famille de l'IL-1, l'IL-33 est à ce jour définie comme une alarmine : produite et retenue dans les noyaux des cellules structurales en homéostasie, elle est relâchée dans le milieu extracellulaire en réponse à des dommages tissulaires ou signaux inflammatoires dans le but de recruter et activer le système immunitaire (Liew *et al.*, 2016; Martin et Martin, 2016).

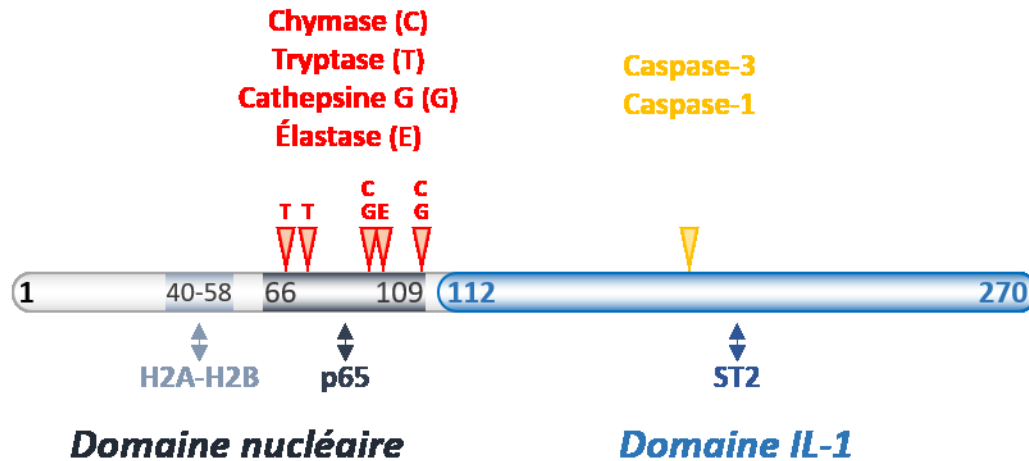


Figure 1. Structure de l'IL-33 et sites de clivages. Le domaine nucléaire en N-terminal est indiqué en gris, avec le site de liaison aux histones (aa 40 à 58) et le site de liaison à p65 (aa 66 à 109). Le domaine IL-1 en C-terminal qui interagit avec le récepteur ST2 est présenté en bleu. Les sites de clivages activateurs par les enzymes granulocytaires sont indiqués en rouge. Le site de clivage inhibiteur par les caspases est indiqué en jaune.

2.2. Profil d'expression de l'IL-33

L'IL-33 est exprimée de façon ubiquitaire au niveau tissulaire, mais relativement restreinte au niveau cellulaire (Cayrol et Girard, 2018). En effet, son expression est constitutive et majeure dans les cellules endothéliales des veinules à endothélium épais afférentes aux ganglions lymphatiques (Baekkevold *et al.*, 2003) et des vaisseaux sanguins (Moussion *et al.*, 2008), ainsi que dans les cellules fibroblastiques réticulaires des organes lymphoïdes et dans les cellules épithéliales en contact avec l'environnement (peau, tube digestif, voies aériennes et poumons, muqueuse vaginale) (Moussion *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2005). En condition homéostatique, l'IL-33 est localisée au niveau nucléaire dans ces types cellulaires. Cette expression peut être réprimée dans les cellules endothéliales proliférantes en conditions angiogéniques, telles que dans les plaies cicatrisantes (Kuchler *et al.*, 2008), ou en contexte d'inflammation aigüe en réponse aux cytokines inflammatoires IL-1 β et TNF α (*Tumor necrosis factor α*) (Kuchler *et al.*, 2008), mais reste forte en condition d'inflammation chronique (Carriere *et al.*, 2007; Moussion *et al.*, 2008). En revanche, la production d'IL-33 est augmentée par le TNF α , l'activation du TLR3 et le stress oxydatif dans les cellules épithéliales pulmonaires (Lin *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016a; Uchida *et al.*, 2017), par l'activation du TLR4 dans les cellules épithéliales cornéennes (Li *et al.*, 2016), ou par l'IFN γ dans les cellules épithéliales œsophagiennes (Shan *et al.*, 2016). Ainsi,

l'expression épithéliale d'IL-33 est fortement augmentée dans divers contextes inflammatoires, tels que l'asthme (Prefontaine *et al.*, 2010), les allergies (Li *et al.*, 2016), la colite ulcéreuse (Gundersen *et al.*, 2016), et diverses infections virales (Jackson *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016; Mahmutovic Persson *et al.*, 2018) ou fongiques (Heyen *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016b). Plus récemment, l'expression de l'IL-33 a aussi été caractérisée dans le système nerveux central murin en développement et adulte, au niveau des oligodendrocytes, des astrocytes et de la microglie (Allan *et al.*, 2016; Wicher *et al.*, 2013). Cette expression est retrouvée dans les lésions de cerveaux affectés par la maladie d'Alzheimer (Chapuis *et al.*, 2009) et la sclérose en plaque (Allan *et al.*, 2016).

Bien que non constitutive, l'expression de l'IL-33 au niveau nucléaire est aussi induite en condition inflammatoire dans les hépatocytes (Arshad *et al.*, 2013) et kératinocytes (Meephansan *et al.*, 2013). De même, l'induction de l'expression cytoplasmique de l'IL-33 par des forces contractiles et des cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IFN γ) a été observée dans les cellules des muscles lisses (Prefontaine *et al.*, 2009) et dans les fibroblastes (Schmitz *et al.*, 2005).

L'IL-33 a aussi été détectée dans les cellules myéloïdes dans des modèles murins d'asthme allergique ou d'infection par le virus respiratoire syncytial (RSV) (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2015; Tashiro *et al.*, 2016). Cette induction a été reproduite *in vitro* en réponse au Lipopolysaccharide (LPS) dans les monocytes/macrophages (Nile *et al.*, 2010; Ohno *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2016), et est amplifiée en présence de stimulation adrénergique (Yanagawa *et al.*, 2011a) ou de prostaglandine (PG)E₂ (Yanagawa *et al.*, 2011b) dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. Finalement, les érythrocytes et plaquettes, qui constituent un réservoir important d'IL-33 intracellulaire, ont été proposés comme une source majeure d'IL-33 sérique en conditions hémolytiques (Takeda *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2015).

2.3. L'IL-33 comme facteur nucléaire

2.3.1. Condensation de la chromatine

L'IL-33 a été initialement caractérisée comme un facteur nucléaire associé à l'hétérochromatine dans les cellules endothéliales (Carriere *et al.*, 2007). Bien qu'une séquence consensus de localisation nucléaire (NLS) soit présente dans le domaine N-terminal (aa 61-78), des expériences de mutations ponctuelles ont montré que ce site n'était

pas nécessaire à la localisation nucléaire de l'IL-33 surexprimée et étiquetée avec la protéine fluorescente verte (GFP) (Carriere *et al.*, 2007). En revanche, un domaine putatif homéotique conservé de type hélice-tour-hélice (aa 1-65) a été identifié comme « nécessaire et suffisant » à cette localisation (Carriere *et al.*, 2007). Plus tard, un motif de liaison au dimère d'histone H2A-H2B a été identifié au niveau des résidus 40 à 58 (Roussel *et al.*, 2008). La liaison de l'IL-33 aux histones conduit à l'oligomérisation des nucléosomes, la condensation de la chromatine et une répression de l'activité transcriptionnelle (Carriere *et al.*, 2007).

2.3.2. Interactions avec la voie NF- κ B

Dans des lignées de fibroblastes et kératinocytes, l'IL-33 a été immuno-précipitée avec le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) au niveau nucléaire et cytosolique (Ali *et al.*, 2011). Cette interaction met en jeu le domaine N-terminal de l'IL-33 (aa66-109) et le domaine RHD de p65, impliqué dans la liaison à son inhibiteur I κ B ou à l'ADN. Ainsi, en présence d'activateurs de la voie NF κ B (IL-1 β , TNF α , LPS), I κ B est dégradé et le dimère p65-p50 libéré est neutralisé par l'IL-33, diminuant sa fixation à l'ADN et son activité transcriptionnelle (Ali *et al.*, 2011).

Parallèlement, Choi *et al* ont montré que l'IL-33 intracellulaire peut lier le promoteur de la sous-unité p65 de NF- κ B, favorisant son expression transcriptionnelle (Choi *et al.*, 2012). Cette régulation de NF- κ B par l'IL-33 dans les cellules endothéliales est nécessaire au maintien de l'expression basale des intégrines ICAM-1 et VCAM-1 et à leur surexpression en réponse au TNF α .

2.4. L'IL-33 comme cytokine

2.4.1. Le récepteur ST2

Le récepteur ST2 (aussi appelé T1/ST2, IL-1R4, DER4, Fit-1, IL-33R α) a été mis en évidence chez la souris en 1989, puis chez l'homme en 1990, grâce à sa similarité de séquence avec les membres de la superfamille des immunoglobulines, et particulièrement avec le récepteur à l'IL-1 (IL-1R) (Tominaga, 1989; Tominaga *et al.*, 1992). Orphelin jusqu'à l'identification de l'IL-33 comme ligand physiologique, il était néanmoins déjà connu pour être exprimé par les cellules hématopoïétiques et associé à l'immunité de type 2 (Coyle *et al.*, 1999; Lohning *et al.*, 1998; Townsend *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1998).

2.4.1.1. Les isoformes protéiques du récepteur ST2

Quatre isoformes protéiques codées par le gène ST2 ont été décrites : ST2L, sST2, ST2V et ST2LV (Figure 2) (Kakkar et Lee, 2008). Ces 4 isoformes sont issues de 2 promoteurs alternatifs, plusieurs sites alternatifs d'initiation de la transcription et 2 sites alternatifs de polyadénylation et de l'épissage alternatif, dépendamment du type cellulaire et des stimuli appliqués (Bergers *et al.*, 1994; Iwahana *et al.*, 1999).

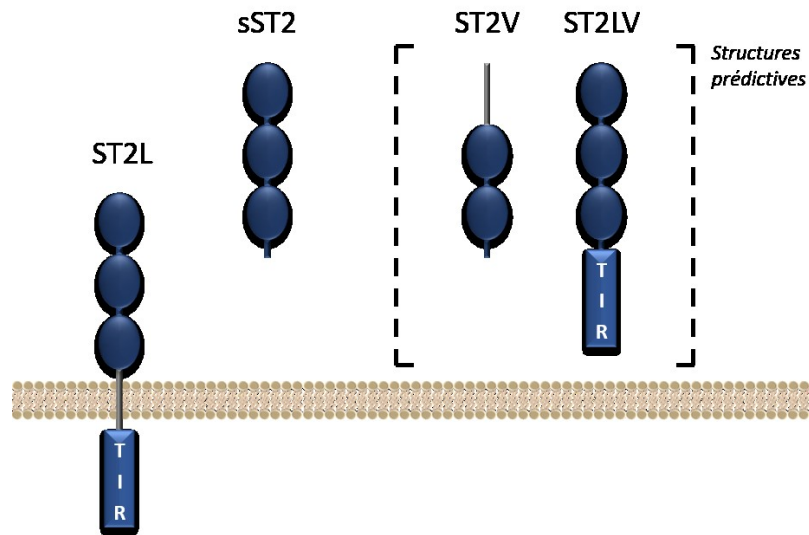


Figure 2. Les isoformes du récepteur ST2. L'isoforme longue ST2L est composée d'un domaine TIR intracellulaire, d'un domaine transmembranaire et de trois domaines immunoglobulines extracellulaires. L'isoforme soluble sST2 est composée de trois domaines immunoglobulines. L'isoforme ST2V possède deux domaines immunoglobulines et une extrémité C-terminale non structurée. L'isoforme ST2LV est composée des domaines intracellulaires et extracellulaires de l'isoforme ST2L mais est dépourvue du domaine transmembranaire. L'expression des isoformes ST2V et ST2LV n'a jamais été révélée au niveau protéique chez l'humain.

ST2L est un récepteur membranaire de 556aa et 63kDa, responsable de transduire les propriétés inflammatoires de l'IL-33. Il est composé d'un domaine intracellulaire C-terminal de type Toll/Interleukine (TIR), d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine extracellulaire N-terminal avec trois motifs de type immunoglobuline communs à la famille des récepteurs de type IL-1R (Bergers *et al.*, 1994; Iwahana *et al.*, 1999; Yanagisawa *et al.*, 1993). L'isoforme sST2 est un récepteur soluble de 328aa et 37kDa, permettant de neutraliser l'activité de l'IL-33. Il est composé du même domaine extracellulaire que le récepteur membranaire. Issus de l'inclusion d'un exon qui introduit un codon stop précoce, il diffère du récepteur membranaire de 5 aa au niveau de sa séquence C-terminal et est dépourvu de

domaine transmembranaire et intracellulaire (Iwahana *et al.*, 1999; Tominaga *et al.*, 1992; Yanagisawa *et al.*, 1993).

L'expression de ST2L et sST2 a été initialement caractérisée au niveau transcriptionnel, révélant une expression préférentielle dans les reins, les poumons, le foie et le placenta (Kumar *et al.*, 1997). Au niveau cellulaire, elle est induite ou augmentée par l'agent mitotique PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) dans des lignées de cellules lymphoïdes, myéloïdes, fibroblastiques et endothéliales (Kumar *et al.*, 1997). L'expression de ST2L a ensuite été confirmée par détection de la protéine ou réponse fonctionnelle dans la plupart des cellules hématopoïétiques : ILC2s (Neill *et al.*, 2010), lymphocytes Th2 (Lohning *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998), mastocytes (Kondo *et al.*, 2008; Moritz *et al.*, 1998), basophiles (Kondo *et al.*, 2008; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009; Smithgall *et al.*, 2008), cellules NK (*Natural Killer*) et iNKT (*innate Natural Killer T cells*) (Bourgeois *et al.*, 2009; Smithgall *et al.*, 2008), cellules dendritiques (Rank *et al.*, 2009), monocytes (Mun *et al.*, 2010), macrophages (Espinassous *et al.*, 2009; Joshi *et al.*, 2010), T régulateurs (Turnquist *et al.*, 2011), lymphocytes B1 (Ahmed et Koma, 2015; Komai-Koma *et al.*, 2011). Enfin, le récepteur ST2L est généralement surexprimé dans les cellules hématopoïétiques activées, en présence d'IL-3 par les basophiles (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009), ou de LPS, IL-6, TNF α et IL-1 α dans les macrophages (Oshikawa *et al.*, 2002; Saccani *et al.*, 1998). De même, le récepteur ST2L est exprimé par les cellules endothéliales pulmonaires, et peut être induit dans les cellules épithéliales, cellules des muscles lisses bronchiques et cardiomyocytes en réponse au PMA (Oshikawa *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2002). L'IL-33 peut aussi augmenter l'expression de son récepteur membranaire dans plusieurs types cellulaires (Guo *et al.*, 2009; Komai-Koma *et al.*, 2011; Stolarski *et al.*, 2010). L'expression du récepteur sST2 est ubiquitaire et répond positivement aux stimuli inflammatoires précités (Oshikawa *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2002). Sa concentration sérique ou tissulaire est notamment augmentée dans beaucoup de contextes inflammatoires où elle est souvent positivement corrélée avec la production d'IL-33 (Kamekura *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Mertz *et al.*, 2016; Pastorelli *et al.*, 2009; Savinko *et al.*, 2012). Parmi les cellules lymphoïdes, les récepteurs ST2L et sST2 ont des profils d'expression opposés (Griesenauer et Paczesny, 2017). En effet, l'expression de ST2L est plus forte et stable dans les cellules CD4⁺ et CD8⁺ de type 2 et n'est que transitoirement induite par la stimulation du TCR dans les cellules de

type 1 alors que le récepteur sST2 est produit plus fortement dans les lymphocytes Th1, Th17, Tc1 et Tc17 (Baumann *et al.*, 2015; Griesenauer et Paczesny, 2017; Guo *et al.*, 2009; Lohning *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2011).

Les isoformes ST2V et ST2LV sont codés par des variants d'épissage alternatif. ST2V est issu de l'insertion d'une séquence exonique et d'un codon stop précoce, conduisant au remplacement du troisième motif immunoglobuline par une queue C-terminal hydrophobe comparativement à l'isoforme sST2 (Tominaga *et al.*, 1999). ST2V est exprimé au niveau transcriptionnel dans l'estomac, le côlon, le petit intestin, les poumons, la rate, ainsi que dans plusieurs lignées leucémiques, et code pour une protéine de 40kDa localisée à la membrane plasmique dans un modèle de surexpression (Tago *et al.*, 2001). Au contraire ST2LV est un isoforme identifié chez le poulet, issu de l'exclusion de l'exon codant le domaine transmembranaire de ST2L (Iwahana *et al.*, 2004). Il n'existe à ce jour aucune évidence d'une expression au niveau protéique *in vivo* de ces deux isoformes.

2.4.1.2. Signalisation du récepteur ST2L

Le complexe de signalisation de l'IL-33 est un hétérodimère composé du récepteur ST2L et de la protéine accessoire du récepteur à l'IL-1 (IL-1RAcP) (Ali *et al.*, 2007; Chackerian *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2008). Suite à liaison de l'IL-33 avec les trois domaines immunoglobulines de ST2L, puis le recrutement de l'IL-1RAcP (Liu *et al.*, 2013), l'interaction des domaines TIR intracellulaires des deux chaînes réceptrices induit le recrutement successif de la protéine adaptatrice Myd88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), des sérine-thréonine kinases IRAK-4 et IRAK-1 (*IL-1 receptor-associated kinases-1* /-4), et de l'ubiquitine-ligase TRAF (*TNF receptor associated factor*)-6, initiant l'activation des voies des MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) p38, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) ainsi que du facteur de transcription NF- κ B via la dégradation de son inhibiteur I κ B (Figure 3) (Funakoshi-Tago *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2005). Ce modèle de signalisation a été initialement caractérisé dans des modèles de surexpression (dans les cellules Jurkat et HEK-293) (Kumar *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2005) ou en présence d'anticorps activateurs induisant le pontage des récepteurs ST2L (Brint *et al.*, 2002). Il a ensuite été vérifié dans des basophiles primaires murins et humains où l'auto-ubiquitination de TRAF-6 induite par l'IL-33 est nécessaire à l'activation de p38, JNK et NF- κ B, mais pas de ERK1/2 (Funakoshi-Tago *et al.*, 2008;

Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009). Dans des monocytes humains stimulés à l'IL-33, Mun *et al.* ont révélé la phosphorylation de la kinase TAK-1 (*TGFβ-activated kinase*), connue pour être recrutée par TRAF-6 et mener à l'activation de p38, JNK et NFκB (Mun *et al.*, 2010). Dans cette même étude, l'IL-33 activait aussi les kinases Syk et Akt, ainsi que la phospholipase Cy2 dans les monocytes humains (Mun *et al.*, 2010). Dans des cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse, Gopfert *et al.* ont confirmé l'activation de Akt et S6K1 (*S6 kinase 1*) dépendamment de l'axe Myd88/TAK-1/p38 (Gopfert *et al.*, 2018). L'activation de la voie de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et S6K1 dépendamment de l'axe TRAF-6/Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt a aussi été observé dans une lignée endothéliale lymphatique (Han *et al.*, 2017) et dans des ILC2s (Salmond *et al.*, 2012). Enfin, l'activation de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) en réponse à l'IL-33 a été montrée dans des ostéoblastes primaires murins (Schulze *et al.*, 2011).

Dans des cellules épithéliales murines, la liaison de l'IL-33 à son récepteur active les kinases FAK (*Focal adhesion kinase*) et GSK3β (*Glycogen synthase kinase-3 beta*) (Zhao *et al.*, 2015). La GSK3β phosphoryle ST2L sur le résidu Ser⁴⁴², induisant l'internalisation du récepteur et le recrutement de FBXL19, une E3 ubiquitine-ligase (Zhao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2012). L'ubiquitination de ST2L par FBXL19 conduit à sa dégradation par le protéasome (Zhao *et al.*, 2012).

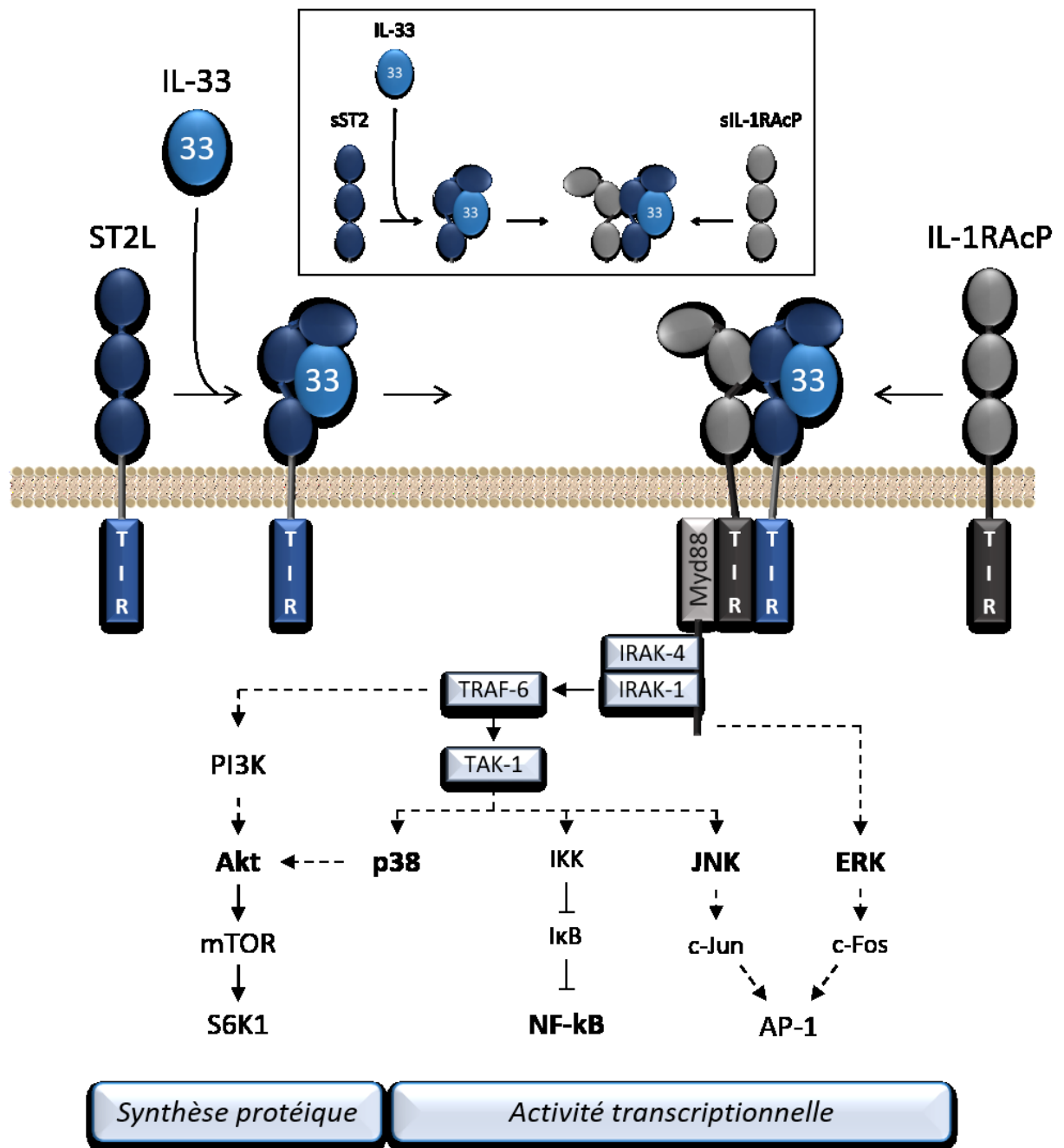


Figure 3. Signalisation du récepteur ST2L. La liaison de l'IL-33 à son récepteur ST2 est stabilisée par le recrutement de l'IL-1RAcP. L'association des domaines intracellulaires TIR de ST2L et de l'IL-1RAcP permet le recrutement de MyD88 et la formation du complexe de signalisation conduisant à l'activation des voies de Akt/mTOR, des MAPKs et de NF-κB.

2.4.2. Régulation de l'activité cytokinique de l'IL-33

2.4.2.1. Épissage alternatif

Le gène codant pour l'IL-33 humaine est composé de 8 exons avec un cadre de lecture s'étendant de l'exon 2 à l'exon 8. Dix transcrits issus de l'épissage alternatif des exons 3, 4 et 5 ont été caractérisés et sont exprimés dans des proportions différentes selon les types cellulaires (Gordon *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2011; Tsuda *et al.*, 2012). L'épissage alternatif affecte peu les séquences peptidiques des différents isoformes protéiques mais influe sur leur localisation cellulaire et leur activité (Gordon *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2011). En effet, le variant long présente une localisation nucléaire alors que l'épissage des exons 3 et 4 conduit à une localisation cytoplasmique et facilite la sécrétion de la protéine, et l'épissage de l'exon 5 codant pour la portion N-terminale du domaine cytokinique réduit considérablement son activité (Gordon *et al.*, 2016).

2.4.2.2. Maturation par les protéases inflammatoires

En tant que cytokine de la famille de l'IL-1, l'IL-33 a initialement été proposée comme cible de la caspase-1 pour donner un fragment actif IL-33₁₁₂₋₂₇₀ (Schmitz *et al.*, 2005). Les études suivantes ont démontré que la caspase pouvait en effet cliver l'IL-33 mais à des concentrations non physiologiques (Cayrol et Girard, 2009; Luthi *et al.*, 2009). De plus, le clivage ciblait le domaine IL-1 et abrogeait l'activité de l'IL-33 plutôt que de l'amplifier (Cayrol et Girard, 2009). Au contraire, les protéases neutrophiliques, élastase et cathepsine G, ainsi que les protéases mastocytaires, chymase et tryptase, clivent l'IL-33 entre les domaines nucléaires et IL-1 (Figure 1). Ceci a pour effet d'augmenter l'affinité du domaine IL-1 au récepteur ST2 et ainsi de potentialiser l'activité biologique de l'IL-33 (Lefrancais *et al.*, 2014; Lefrancais *et al.*, 2012). Les sites de clivages situés entre les résidus Lys₇₁ et Leu₁₀₈ donnent 5 fragments biologiquement actifs : IL-33₁₀₉₋₂₇₀ (18kDa), IL-33₉₉₋₂₇₀ (20kDa), IL-33₉₅₋₂₇₀ (21kDa), IL-33₇₉₋₂₇₀ (25kDa) et IL-33₇₂₋₂₇₀ (26kDa). Au contraire, le fragment IL-33₁₁₂₋₂₇₀ initialement proposé n'a finalement jamais été détecté *in vivo*.

2.4.2.3. Mécanismes d'inactivation de l'IL-33

En tant qu'alarmine, il est essentiel que l'IL-33 soit régulée afin de ne pas (sur)activer le système immunitaire dans des contextes physiologiques ou inflammatoires contrôlés.

En contexte apoptotique, l'IL-33 est clivée par les caspases apoptotiques après le résidu Asp₁₇₈ au sein du domaine IL-1 (Figure 1) et les produits de clivages sont rapidement dégradés par les protéases sériques telles que l' α -chymotrypsine et la protéinase K (Ali *et al.*, 2010; Cayrol et Girard, 2009; Luthi *et al.*, 2009). De plus, la forte affinité de l'IL-33 pour la chromatine limite la diffusion de la cytokine (Roussel *et al.*, 2008). Ainsi, l'IL-33 est rapidement inactivée et éliminée pendant l'apoptose, alors qu'elle est relâchée sous forme active dans le milieu extracellulaire au cours de la nécrose (Luthi *et al.*, 2009). L'IL-33 libérée sous sa forme active peut-être neutralisée par son récepteur soluble sST2 ou oxydée. L'oxydation de l'IL-33 conduit à la formation de 2 ponts disulfures et un changement conformationnel dans son domaine de liaison au récepteur ST2, inactivant ainsi la cytokine (Cohen *et al.*, 2015).

2.4.3. Rôles de l'IL-33 dans la régulation de l'inflammation

2.4.3.1. Rôles de l'IL-33 dans l'immunité de type 2

In vivo, la surexpression ou l'injection intrapéritonéale d'IL-33 à des souris de type sauvage provoque une forte inflammation éosinophilique, une augmentation des niveaux sériques d'IgE et IgA, la production d'IL-5, IL-13 et IL-4 dans le thymus, la rate, le foie et le poumon, ainsi qu'une hyperplasie de l'épithélium bronchique et stomacal avec forte production de mucus et infiltration d'éosinophiles et cellules mononuclées (Kondo *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2005; Zhiguang *et al.*, 2010). Ces résultats, ainsi que l'expression dominante du récepteur ST2L par les cellules Th2, mastocytes et ILC2s, ont très vite associé l'IL-33 à l'immunité de type 2 et révélé son implication majeure dans les allergies, l'asthme et les défenses antiparasitaires (Guo *et al.*, 2015; Hardman et Ogg, 2016; Komai-Koma *et al.*, 2011; Louten *et al.*, 2011; Mizutani *et al.*, 2013).

Au niveau cellulaire, l'IL-33 induit directement la production d'IL-5 et IL-13 par les mastocytes (Allakhverdi *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2014), basophiles (Smithgall *et al.*, 2008) et lymphocytes Th2 (Endo *et al.*, 2015). De plus, l'IL-33 oriente la maturation des cellules dendritiques vers un profil favorisant la polarisation des lymphocytes T naïfs en Th2 atypiques IL-5⁺ IL-13⁺ IL-4⁻ (Besnard *et al.*, 2011; Rank *et al.*, 2009). Les productions abondantes d'IL-5 et d'IL-13 conduisent à l'éosinophilie et à l'activation épithéliale, respectivement, induites par l'IL-33 *in vivo* (Kondo *et al.*, 2008; Schmitz *et al.*, 2005).

L'IL-33 agit comme agent chimiotactique sur les lymphocytes Th2 (Komai-Koma *et al.*, 2007), et augmente la sécrétion de diverses chimiokines – CCL1, IL-8, MCP (*Monocyte chemoattractant protein*)-1, CCL5, MIP (*Macrophage inflammatory protein*)-1 α , MIP-1 β , CCL17 – et cytokines – IL-4, IL-6, IL-9, IL10, TGF β (*Transforming growth factor beta*), GM-CSF – par les granulocytes, permettant de recruter et activer l'immunité de type 2 (Allakhverdi *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009; Smithgall *et al.*, 2008; Stolarski *et al.*, 2010; Suzukawa *et al.*, 2008). L'alarmine promeut aussi la survie et la dégranulation des éosinophiles (Cherry, 2008), et bien qu'elle n'induisse pas *per se* la dégranulation des mastocytes et basophiles, elle l'augmente en réponse aux IgE (Andrade *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2010; Suzukawa *et al.*, 2008). Enfin, l'IL-33 promeut la polarisation des macrophages M2 induite par l'IL-13 (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014), ainsi que la prolifération et la production d'IgM par les lymphocytes B1 (Komai-Koma *et al.*, 2011).

2.4.3.2. Rôles de l'IL-33 dans l'immunité de type 1

Le récepteur ST2L est exprimé de façon transitoire au cours de l'activation primaire des cellules Th1 et Tc1 (Baumann *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011). Ainsi, l'IL-33 promeut l'immunité antivirale en favorisant l'acquisition des fonctions effectrices des cellules T de type 1 lors d'une infection primaire (Bonilla *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011). Dans ce même modèle, le développement des cellules T mémoires n'est pas affecté par l'alarmine (Bonilla *et al.*, 2012). En revanche, l'IL-33 promeut la prolifération, la production d'IFN γ et l'acquisition du phénotype mémoire par les cellules NK (*Natural killer*), favorisant l'immunité contre des infections subséquentes (Bourgeois *et al.*, 2009; Nabekura *et al.*, 2015).

2.4.3.3. Rôles de l'IL-33 dans le maintien de l'homéostasie

Dans plusieurs contextes tissulaires, homéostatiques ou inflammatoires, l'IL-33 participe au maintien des populations immunes tolérogènes. En périphérie, la cytokine induit la prolifération des Treg en agissant directement sur la sous-population Foxp3⁺ST2⁺ (Matta et Turnquist, 2016), ou indirectement en favorisant la différenciation de DCs immatures et cellules myéloïdes suppressives à partir des précurseurs de la moelle osseuse (Turnquist *et al.*, 2011). Dans le tissu adipeux viscéral, l'activation des ILC2s par l'IL-33 permet l'accumulation de Treg, de rares Th2 et d'éosinophiles qui inhibent l'accumulation des

lymphocytes T CD8⁺ (Hu et Zhao, 2015; Molofsky *et al.*, 2015). À la suite d'un état inflammatoire dans l'intestin, l'IL-33 potentialise la polarisation des Treg induite par le TGFβ et ainsi maintient la population tolérogène (Schiering *et al.*, 2014). Enfin, dans le placenta, l'IL-33 produite par les cellules stromales déciduales polarise les macrophages vers un profil régulateur (TGFβ⁺IL10⁺) et inhibe la cytotoxicité des cellules NK, créant un environnement favorable à l'implantation du fœtus (Hu *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2014).

Finalement, l'IL-33 produite par les ostéoblastes différenciés ou en présence de TNFα dans la moelle osseuse inhibe la formation des ostéoclastes au profit d'une différenciation en macrophages M2 anti-inflammatoires, protégeant contre la résorption osseuse induite par les cytokines inflammatoires (Schulze *et al.*, 2011; Zaiss *et al.*, 2011). De même, la polarisation des macrophages M2 pro-fibrotiques et la production de matrice extracellulaire en réponse à l'IL-33 accélèrent le processus de cicatrisation (Yin *et al.*, 2013).

2.5. Rôle de l'IL-33 dans l'asthme

Au cours d'une réaction asthmatique, l'IL-33 est relâchée abondamment par les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires et fibroblastiques en réponse aux allergènes, virus ou dommages tissulaires (Jackson *et al.*, 2014; Makrinioti *et al.*, 2014; Prefontaine *et al.*, 2009; Prefontaine *et al.*, 2010), et agit comme puissant initiateur de l'immunité de type 2 et des symptômes asthmatiques (Kondo *et al.*, 2008; Makrinioti *et al.*, 2014). De plus, les gènes codant l'IL-33 et son récepteur ST2 font partie des gènes les plus associés à l'asthme, particulièrement à l'asthme à profil inflammatoire de type 2 (Gordon *et al.*, 2016; Lavoie-Charland *et al.*, 2016; Ober, 2016; Russell et Brightling, 2017). La capacité des anticorps anti-IL-33 ou du récepteur sST2 à réduire l'inflammation bronchique de type 2 a été confirmée dans plusieurs modèles murins (Lee *et al.*, 2014; Teufelberger *et al.*, 2018), si bien qu'un anticorps anti-ST2 est actuellement à l'essai en phase II d'étude clinique (Amgen, 2013). Enfin, l'expression de l'IL-33 chez des enfants sensibilisés aux fungi est élevée et résistante aux corticostéroïdes (Castanhinha *et al.*, 2015), et le recrutement et l'activation des lymphocytes Th2 ST2⁺ mémoires par l'IL-33 a été démontré comme un mécanisme de résistante aux corticostéroïdes chez la souris (Mato *et al.*, 2017), confortant le potentiel thérapeutique des anti-ST2 pour l'asthme à profil inflammatoire de type 2 et réfractaire aux traitements disponibles (Hirahara *et al.*, 2018).

Finalement, le rôle de l'IL-33 dans le maintien des populations tolérogènes (cf. section 2.4.3.3) et certaines études sur les souris déficientes pour le récepteur ST2 suggèrent un rôle protecteur possible de l'IL-33 dans certains contextes asthmatiques (Verma *et al.*, 2017; Zoltowska Nilsson *et al.*, 2018). De plus, bien que l'IL-33 soit aussi exprimé dans des modèles d'asthme à faible profil inflammatoire de type 2 (Cho *et al.*, 2012) ou neutrophilique (Mahmutovic Persson *et al.*, 2018), son implication dans la pathogenèse des différents endotypes reste à être confirmée.

3. LES CYSTEINYL-LEUCOTRIENES

3.1. Métabolisme des cystéinyl-leucotriènes

Les leucotriènes (LTs) sont des médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique (Figure 4). Celui-ci est libéré par hydrolyse des phospholipides membranaires, préférentiellement des phosphatidylcholines, par la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) (Hirabayashi *et al.*, 2004). L'acide arachidonique peut ensuite être métabolisé par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO) qui permet la synthèse des LTs ou par la voie des Cyclooxygénases 1 et/ou 2 qui aboutit à la synthèse des prostaglandines (PG) et du thromboxane (Haeggstrom et Funk, 2011). La réaction d'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la cPLA2 libère aussi du glycéro-phosphatidyl-choline ou lyso-PAF, précurseur du facteur d'activation plaquettaire (PAF) (Prescott *et al.*, 2000).

La 5-LO catalyse la production du LTA₄ à partir de l'acide arachidonique qui lui est présenté par la protéine FLAP (*Five Lipoxygenase Activating Protein*) (Dixon *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1991). Cette réaction se fait en deux étapes via la synthèse d'un métabolite intermédiaire, l'acide 5-Hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraénoïque (5-HpETE). Le LTA₄ est ensuite hydrolysé en LTB₄ par la LTA₄ hydrolase, ou pris en charge par la LTC₄ synthase (Haeggstrom et Funk, 2011). Cette dernière catalyse la synthèse du LTC₄ en conjuguant une molécule de glutathion sur le LTA₄ (Lam et Frank Austen, 2000). Une fois synthétisé, le LTC₄ est exporté vers le milieu extracellulaire via le transporteur MRP1 (Cole et Deeley, 2006). Là, il peut alors agir sur sa cible ou être métabolisé en LTD₄ puis LTE₄ par la γ -glutamyl-transpeptidase et des peptidases extracellulaires, respectivement (Carter *et al.*, 1997; Habib *et al.*, 1998; Mayatepek *et al.*, 2004). Étant porteurs d'un résidu cystéinyl, les LTC₄, LTD₄ et LTE₄ forment la famille des cysLTs. Finalement, les cysLTs peuvent être

éliminés via la N-acétylation ou la β -oxydation du LTE_4 dont les dérivés sont éliminés dans les urines (Huber *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1990).

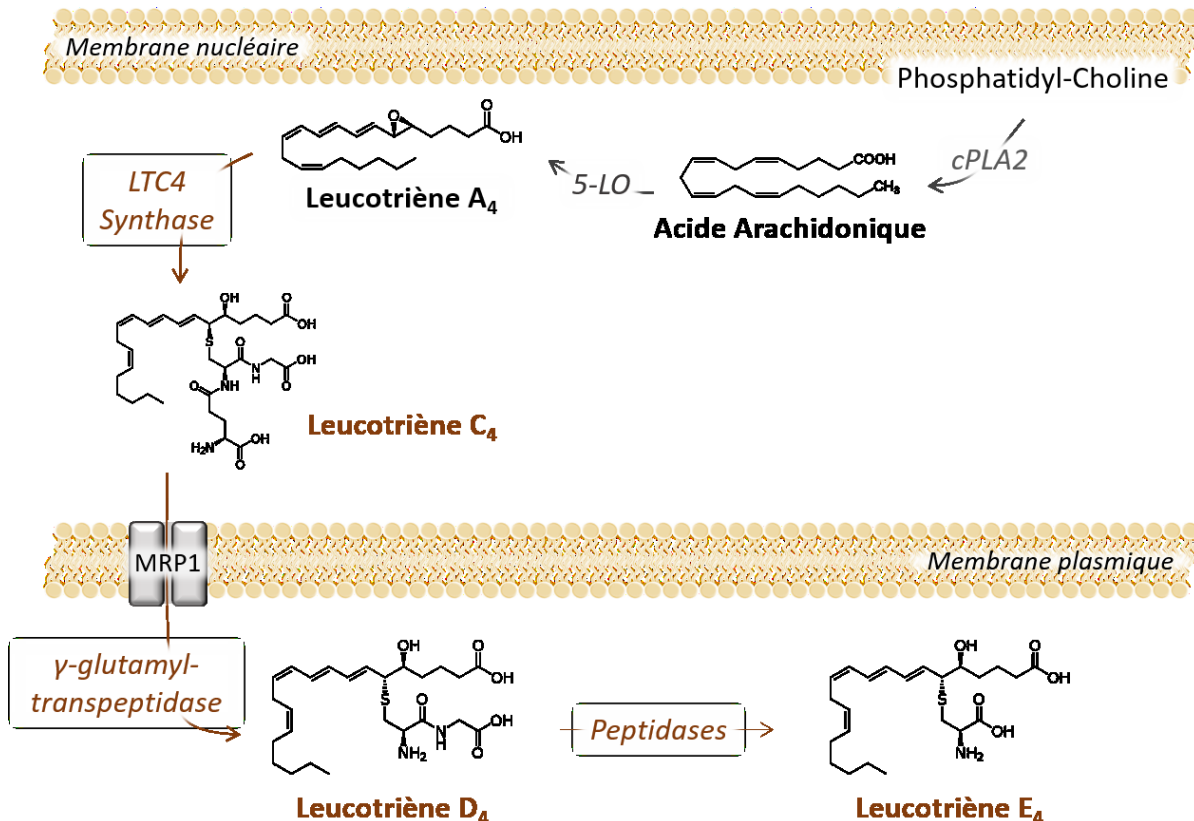


Figure 4. Synthèse des cystéinyl-leucotriènes à partir de l'acide arachidonique.

3.2. Régulation de la production des cysLTs

Issus d'une cascade enzymatique, la synthèse des cysLTs est dépendante de l'expression et de l'activation des enzymes cPLA2, 5-LO et LTC₄ synthase.

La cPLA2 peut être activée par une grande variété de stimuli incluant des facteurs de croissance, l'engagement d'intégrines, le pontage des récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines, des cytokines... En augmentant la concentration en ions calciques libres dans le cytosol, ces stimuli induisent la translocation de l'enzyme du cytosol à la membrane nucléaire où se trouvent ses substrats (Glover *et al.*, 1995). L'activité enzymatique de la cPLA2 peut être augmentée par phosphorylation par les MAPKs, la CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) et MNK1 (MAPK interacting protein kinase 1) (Hirabayashi *et al.*, 2004), ou par la liaison de phospholipides anioniques tels que le PIP_2 et

le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP₃) (Haeggstrom et Funk, 2011; Hirabayashi *et al.*, 2004).

L'expression de la 5-LO est principalement restreinte aux cellules myéloïdes, et concorde avec l'expression de la protéine FLAP (Haeggstrom et Funk, 2011; Werz, 2002). Cette expression est induite notamment par le TGFβ, le TNFα, la vitamine D3, et le GM-CSF, alors qu'elle est inhibée par l'IL-4. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la 5-LO accompagne la différenciation des monocytes en macrophages (Haeggstrom et Funk, 2011; Werz, 2002). Les ions calciques Ca²⁺, ainsi que l'ATP, le Mg²⁺ et les hydro-péroxydes lipidiques sont aussi des régulateurs positifs de l'activité de la 5-LO en favorisant sa liaison aux phosphatidylcholines membranaires et à la FLAP, ou en augmentant directement son activité catalytique (Radmark et Samuelsson, 2009). Les MAPKs et la protéine kinase A (PKA) qui induisent et inhibent la translocation au noyau de la 5-LO, respectivement, régulent aussi l'accès de l'enzyme à son substrat (Hofmann et Steinhilber, 2013; Radmark et Samuelsson, 2009).

Enfin, l'activité de la LTC₄ synthase, protéine à trois domaines transmembranaires localisée à la membrane nucléaire, est régulée négativement par les PKC (Sjolinder *et al.*, 1995). Son expression est plus ubiquitaire que la 5-LO. Dans les leucocytes, elle est induite en réponse à l'IL-3, l'IL-4 et l'IL-5 et diminuée par le TNFα (Lam, 2003).

Ainsi, les cysLTs (LTC₄, LTD₄ et LTE₄) sont synthétisés principalement par les mastocytes et basophiles activés par le pontage des récepteurs FcεRI, mais aussi par les éosinophiles, monocytes/macrophages, DCs, lymphocytes, fibroblastes bronchiques, astrocytes qui possèdent toutes les enzymes et cofacteurs nécessaires à leur production (Ballerini *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; Peters-Golden *et al.*, 2006). De plus, les cellules épithéliales et endothéliales, ainsi que les plaquettes, érythrocytes et cellules des muscles lisses vasculaires expriment la LTC₄ synthase et peuvent participer à la production de cysLTs à partir du LTA₄ produit par les leucocytes (Capra *et al.*, 2015; Laidlaw *et al.*, 2012; Sjöström *et al.*, 2001). La synthèse des cysLTs par les mastocytes peut être induite par divers stimuli induisant leur dégranulation tels que les IgE et le MCP-1 (Campbell *et al.*, 1999). Cette production est aussi augmentée par les cytokines de type Th2, IL-3, IL-4 et IL-5 (Hsieh *et al.*, 2001), la stimulation des récepteurs TLR2/4 par le LPS ou le peptidoglycane (Babolewska *et al.*, 2012) et l'acide lipotéichoïque (Brzezinska-Blaszczyk et Rdzany, 2007),

la chaleur et l'acide salicylique (Mortaz *et al.*, 2007), ainsi que les cysLTs eux-mêmes (Di Capite *et al.*, 2009), alors qu'elle est diminuée en présence d'IL-10 (Babolewska *et al.*, 2012). La synthèse des cysLTs est aussi augmentée en réponse à la PGD₂ et le peptide antimicrobien LL-37 dans les éosinophiles (Mesquita-Santos *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013a), l'activation du récepteur Dectin-2 par les acariens dans les DCs (Barrett *et al.*, 2009) et les cytokines TGFβ et IL-13 dans les monocytes et macrophages pulmonaires humains (Jackson *et al.*, 2012; Riddick *et al.*, 1999), ainsi qu'en réponse au RSV dans les cellules épithéliales bronchiques (Sun *et al.*, 2013b). Au contraire, elle est diminuée en présence de TNFα dans les monocytes (Serio *et al.*, 2007).

3.3. Les récepteurs aux cysLTs

CysLT1, CysLT2 et GPR99 sont trois récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G (GPCR), activés par les cysLTs.

3.3.1. CysLT1

3.3.1.1. Le gène *CYSLT1*

CysLT1 est une protéine de 337aa et 38kDa, chez l'homme (Lynch *et al.*, 1999; Sarau *et al.*, 1999). Le gène *CYSLT1*, situé sur le chromosome X (locus Xq21.5), est composé de 5 exons (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10800>). Quatre transcrits alternatifs de *CYSLT1* ont été décrits (Figure 5) (Woszczek *et al.*, 2005). Le transcrit 3 composé des exons 1, 4 et 5 est le plus abondant et est exprimé de façon ubiquitaire au niveau tissulaire, alors que le transcrit 2 composé des exons 1 et 5 n'a été détecté que dans les leucocytes sanguins et très faiblement dans le poumon et la trachée. Enfin, les transcrits 1 et 4, composés des exons 1-3-4-5 et 1-2-4-5, respectivement, sont beaucoup plus faiblement exprimés et n'ont été détectés que dans la lignée myéloïde THP-1 (Woszczek *et al.*, 2005). La séquence codante pour la protéine CysLT1 étant entièrement localisée dans le cinquième exon, l'épissage alternatif n'affecte pas la séquence protéique du récepteur (Woszczek *et al.*, 2005).

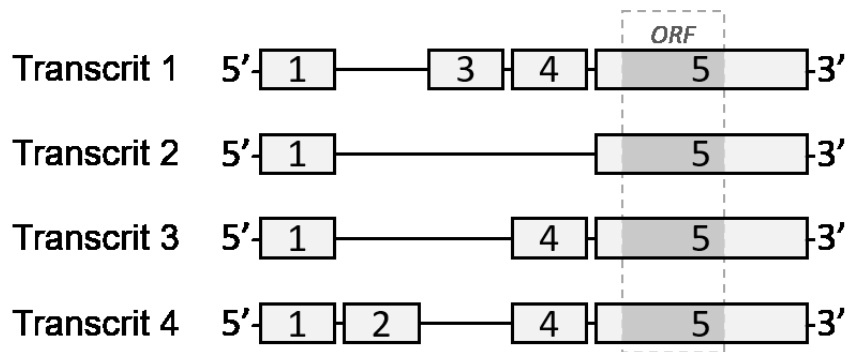


Figure 5. Les transcrits alternatifs de CysLT1. Les exons 1 à 5 sont représentés par les cases en gris pâle. Les traits indiquent les séquences introniques et exoniques épissées pour chaque variant. La séquence codante (ORF) est indiquée en gris foncé.

3.3.1.2. *Profil d'expression du récepteur CysLT1*

CysLT1 est exprimé principalement par les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales glandulaires et intestinales, et les cellules des muscles lisses (Figuerola *et al.*, 2003; Figuerola *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 1999; Shirasaki *et al.*, 2002). Il est fortement exprimé dans la rate, le poumon (majoritairement par les muscles lisses et macrophages interstitiels), le côlon et le pancréas (Lynch *et al.*, 1999; Sarau *et al.*, 1999).

L'expression de CysLT1 est augmentée au niveau transcriptionnel et protéique en réponse au LTD₄ et aux cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13, TGFβ) dans les cellules myéloïdes (Shirasaki *et al.*, 2002; Thivierge *et al.*, 2001), les éosinophiles (Thivierge *et al.*, 2000), les lymphocytes B et T (Early *et al.*, 2007; Thivierge *et al.*, 2015), et dans les cellules épithéliales et cellules des muscles lisses bronchiques (Espinosa *et al.*, 2003; Provost *et al.*, 2012). De plus, la cytokine pro-inflammatoire IFNγ, augmente l'expression de CysLT1 seulement dans les cellules des muscles lisses bronchiques (Amrani *et al.*, 2001). Au contraire, l'expression du récepteur est diminuée en réponse au LPS, au zymosan, à l'IL-10 ou au PGE₂ dans les cellules myéloïdes (Thivierge *et al.*, 2006; Thivierge *et al.*, 2009).

3.3.1.3. *Pharmacologie et signalisation du récepteur CysLT1*

CysLT1 présente une affinité décroissante pour le LTD₄, le LTC₄ et le LTE₄, respectivement, et peut être bloqué par plusieurs antagonistes spécifiques dont le Pranlukast, le Zafirlukast et le Montelukast (Lynch *et al.*, 1999; Sarau *et al.*, 1999). Le récepteur peut être couplé aux protéines Gα_q ou Gα_i. Sa signalisation passe par la formation d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et la mobilisation du calcium intracellulaire qui sont impliqués dans la

réponse chimiotactique et l'expression génique (Capra *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2006; Parmentier *et al.*, 2012). Les voies des MAPKs sont mobilisées : ERK est activée via la PKC α (Hoshino *et al.*, 1998) ou les GTPases Ras/Raf (Capra *et al.*, 2004) dans les lignées monocytaires THP-1 et U937, respectivement, alors que JNK est activée par la PKC ϵ dans les mastocytes (Kondeti *et al.*, 2013) et les THP-1 (Thompson *et al.*, 2008b), et p38 est activée dans les cellules myéloïdes (Thompson *et al.*, 2008b) et dans les cellules épithéliales et musculaires lisses des voies aériennes (Kumasawa *et al.*, 2013; Perng *et al.*, 2006). L'activation de ERK a aussi été décrite dans les cellules des muscles lisses bronchiques (Poulin *et al.*, 2011). La stimulation de CysLT1 peut conduire à l'activation des facteurs de transcription AP-1 (*Activator protein-1*) et NF- κ B, permettant la synthèse de diverses cytokines dont CCL5 dans les cellules pulmonaires mononuclées (Kawano *et al.*, 2003), l'IL-8 dans les THP-1 et cellules dendritiques (Thompson *et al.*, 2006) et MIP-1 β dans les mastocytes (Kondeti *et al.*, 2013). L'activation du facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) a aussi été décrite dans les mastocytes et ILC2s (Kar *et al.*, 2012; von Moltke *et al.*, 2017). Dans les ILC2s, la translocation nucléaire de NFAT induite par CysLT1 agit en synergie avec l'IL-33 dans la production d'IL-5 et IL-13 (von Moltke *et al.*, 2017). Parallèlement, l'activation de p90^{RSK} et CREB est impliquée dans la survie et la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Savari *et al.*, 2014). Enfin, les cysLTs stimulent la prolifération et la migration des cellules souches embryonnaires murines via l'activation de la voie STAT3/PI3K/Akt/Calcineurine/GSK-3 β / β -caténine/NFAT (Kim *et al.*, 2010).

3.3.1.4. Mécanismes de désensibilisation du récepteur CysLT1

Différents mécanismes de désensibilisation homologue et hétérologue ont été décrit pour le récepteur CysLT1.

Dans des cellules HEK-293 et COS surexprimant le récepteur recombinant étiqueté, le LTD₄ induit la phosphorylation des résidus Thr₁₅₁ et Thr₃₂₃ de la queue C-terminale de CysLT1 par les PKC, conduisant à son internalisation (Naik *et al.*, 2005). Dans les basophiles, cette désensibilisation dépendante des PKC contrôle la réponse calcique oscillatoire qui prévient l'inactivation des canaux calciques CRAC, permettant l'activation de NFAT et l'expression du facteur de transcription *c-fos* (Ng *et al.*, 2012). Dans la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2, le LTD₄ induit l'internalisation du récepteur

CysLT1 endogène ou recombinant par un mécanisme dépendant de l'arrestine 3, des clathrines et de Rab5, conduisant à une accumulation périnucléaire de CysLT1 et une expression génique différentielle. Ainsi, la voie ERK1/2 est activée par le récepteur de surface alors que l'augmentation du niveau d'ARNm codant la cyclooxygénase-2 est dépendante du récepteur internalisé (Parhamifar *et al.*, 2010).

La désensibilisation hétérologue du récepteur CysLT1 a été caractérisée dans la lignée myéloïde U937. L'activation des récepteurs couplés aux protéines G_i, P2Y_{2/6}, FRP1 et BLT1, par leurs ligands respectifs ATP/UDP, fMLP et LTB₄, induit la désensibilisation de CysLT1 dépendamment des PKC, alors que les récepteurs couplés aux protéines G_s, β2AR, H1/2R et EP2/4R, activés par l'isoprotérénol, l'histamine et la PGE2, respectivement, désensibilisent le récepteur CysLT1 via les PKA et les PKC (Capra *et al.*, 2010; Capra *et al.*, 2005). Enfin, le PAF, via son récepteur PAFR couplé aux protéines G_{q/11}, induit aussi la désensibilisation de CysLT1, mais par un mécanisme indépendant des PKC et PKA (Capra *et al.*, 2010). Dans ces études, la désensibilisation hétérologue de CysLT1 se traduisait par une réduction de la réponse calcique induite par le LTD₄, mais le récepteur n'était pas internalisé (Capra *et al.*, 2005).

3.3.2. CysLT2

3.3.2.1. Profil d'expression du récepteur CysLT2

CysLT2 est une protéine de 346aa et 40kDa, encodé par le gène *CYSLT2* sur le chromosome 13 (13q14), et présente 38% d'homologie de séquence avec CysLT1 (Heise *et al.*, 2000; Takasaki *et al.*, 2000). Il est fortement exprimé dans le cœur, les organes lymphoïdes secondaires, le système nerveux, le placenta (Heise *et al.*, 2000; Takasaki *et al.*, 2000). CysLT2 est exprimé au niveau des poumons, fortement par les macrophages interstitiels et moins par les muscles lisses (Heise *et al.*, 2000). Son expression est aussi importante dans les leucocytes périphériques où elle est augmentée en réponse au LPS (Thivierge *et al.*, 2006), à l'IFNγ et à l'IL-4 (Early *et al.*, 2007), ainsi qu'à l'IL-13 (Shirasaki *et al.*, 2002). L'IFNγ augmente aussi l'expression de CysLT2 dans les cellules endothéliales et épithéliales, alors que le facteur de croissance épidermique EGF la réprime dans les cellules épithéliales intestinales (Magnusson *et al.*, 2007; Woszczek *et al.*, 2007).

3.3.2.2. Pharmacologie et signalisation du récepteur CysLT2

Le récepteur CysLT2 reconnaît le LTD₄ et le LTC₄ avec une affinité égale mais supérieure au LTE₄ (Heise *et al.*, 2000; Takasaki *et al.*, 2000). Il peut être bloqué par l'antagoniste BAY U9773 commun au CysLT1 (Heise *et al.*, 2000) ou par l'antagoniste spécifique HAMI-3379/CAY-10633 (Wunder *et al.*, 2010), et possède aussi un agoniste spécifique, le N-Méthyl-LTC₄ (Yan *et al.*, 2011).

CysLT2 peut être couplé aux protéines Gα_q et Gα_i. Son activation par les cysLTs induit la relâche du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales (Sjostrom *et al.*, 2003). Dans les HEK-293 surexprimant le récepteur, l'activation de AP-1 et NF-κB par les PKCδ et ζ conduit à la transactivation du promoteur de l'IL-8 (Thompson *et al.*, 2008a). Dans les astrocytes de rat, l'activation des voies ERK et p38 par CysLT2 conduit à l'expression de l'aquaporine-4 et participe aux dommages ischémiques (Qi *et al.*, 2011).

3.3.2.3. Interactions entre les récepteurs CysLT1 et CysLT2

Bien que les récepteurs CysLT1 et CysLT2 activent des voies de signalisation similaires, l'expression de CysLT2 peut conduire à l'inhibition des propriétés prolifératives et parfois inflammatoires de CysLT1 (Barrett *et al.*, 2012; Laidlaw et Boyce, 2012; Savari *et al.*, 2014). Dans les mastocytes, l'effet inhibiteur de CysLT2 est associé à l'hétéro-dimérisation des récepteurs qui conduit à une perte de stabilité du récepteur CysLT1 à la membrane plasmique (Jiang *et al.*, 2007). Dans les cellules épithéliales intestinales, alors que la stimulation au LTD₄ conduit à la phosphorylation de CysLT1 sur un résidu Tyrosine et à la diminution de l'hétéro-dimérisation, la stimulation au LTC₄ semble préserver la dimérisation des récepteurs et induit une internalisation au cytosol des deux récepteurs CysLT1 et CysLT2 (Parhamifar *et al.*, 2010). Ainsi, CysLT1 promeut la survie et la prolifération (Parhamifar *et al.*, 2010) alors que l'expression de CysLT2 augmente la différenciation terminale (Magnusson *et al.*, 2007).

3.3.3. GPR99

Initialement proposé comme récepteur de nucléotides, puis caractérisé comme récepteur de l'α-cétoglutarate, un métabolite du cycle de Krebs (He *et al.*, 2004), le récepteur GPR99 a été plus récemment identifié comme récepteur préférentiel du LTE₄, liant le LTC₄ et le LTD₄ avec une affinité plus faible (Kanaoka *et al.*, 2013). Au niveau tissulaire, GPR99 est exprimé fortement dans le rein et les testicules, et plus faiblement dans les ovaires, la

trachée, les poumons, le système nerveux et le tube digestif (Diehl *et al.*, 2016; Wittenberger *et al.*, 2002). L'expression de GPR99 a aussi été détectée dans la muqueuse nasale, par les cellules endothéliales au niveau protéique (Shirasaki *et al.*, 2017a) et par les cellules épithéliales au niveau transcriptionnel (Bankova *et al.*, 2016). Conformément à ce profil d'expression, GPR99 transduit l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la formation d'œdème sous-muqueux et la production de mucines dans la muqueuse nasale, en réponse au LTE₄ (Bankova *et al.*, 2016).

3.4. CysLTs et asthme

Au cours d'une réaction asthmatique, l'infiltration leucocytaire et l'environnement cytokinique de type 2 induisent la synthèse abondante des cysLTs et la surexpression des récepteurs CysLT1 et CysLT2 dans la muqueuse bronchique (Papadaki *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2005). À l'origine identifiés comme les substances à réaction lente de l'anaphylaxie du fait de leur activité broncho-constrictrice (Dahlen *et al.*, 1980; Sirois et Borgeat, 1980), les cysLTs participent activement à l'établissement des symptômes asthmatiques et du processus inflammatoire (Laidlaw et Boyce, 2012).

3.4.1. Rôle des cysLTs dans la pathogenèse de l'asthme

3.4.1.1. Bronchoconstriction

Les cysLTs sont de puissants agents broncho-constricteurs *in vivo* et *ex vivo* (Dahlen *et al.*, 1980; Sirois et Borgeat, 1980). Cette action directe sur les cellules des muscles lisses bronchiques est réversible en présence des antagonistes spécifiques de CysLT1 (Panettieri *et al.*, 1998).

3.4.1.2. Infiltration leucocytaire

Les cysLTs sont aussi des médiateurs importants de l'inflammation. En tant que facteurs chimiotactiques, ils induisent l'infiltration éosinophilique, monocyttaire et lymphocytaire dépendamment du récepteur CysLT1 (Fregonese *et al.*, 2002; Parmentier *et al.*, 2012; Shirasaki *et al.*, 2017b; Shirasaki *et al.*, 2002; Woszczek *et al.*, 2008). Ils participent aussi à l'infiltration leucocytaire en augmentant la production des chimiokines CCL5, IL-8, MCP-1, MIP-1 α et β ou eotaxin-3 (Ichiyama *et al.*, 2009; Ichiyama *et al.*, 2005; Kawano *et al.*, 2003; Provost *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2006). Enfin, ils favorisent la migration trans-endothéliale en augmentant la perméabilité vasculaire et l'expression des

molécules d'adhésion Mac-1 et p-sélectine à la surface des leucocytes et cellules endothéliales, respectivement (Datta *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 2004).

3.4.1.3. Activation des macrophages

Les cysLTs produits au cours d'une réaction d'asthme allergique potentialisent la phagocytose par les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G à la surface des macrophages alvéolaires (Mancuso et Peters-Golden, 2000; Silva *et al.*, 2010). Ils augmentent aussi l'activité de la NADPH oxydase et induisent la libération d'oxyde nitrique en induisant la synthèse de l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase) via le récepteur CysLT1 (Menard et Bissonnette, 2000; Serezani *et al.*, 2005). Ainsi, ils participent à l'activité antimicrobienne des macrophages alvéolaires.

3.4.1.4. Inflammation de type 2

En agissant de façon autocrine ou paracrine, les cysLTs et le récepteur CysLT1 potentialisent la dégranulation, la survie, la prolifération et la production de cytokines induites par le pontage des récepteurs FcεR ou par l'IL-4 sur les mastocytes et éosinophiles (Jiang *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2009; Mellor *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004), ainsi que la maturation des cellules dendritiques en faveur d'une immunité de type 2 (Barrett *et al.*, 2011). De plus, en agissant sur les différents types cellulaires de la paroi bronchique, les cysLTs augmentent la production de PAF (McIntyre *et al.*, 1986), du facteur Von Willebrand (Datta *et al.*, 1995) et de diverses cytokines (TNFα, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, TGFβ) participant à l'établissement et au maintien de l'environnement inflammatoire asthmatique (Ichiyama *et al.*, 2007; Rola-Pleszczynski et Stankova, 2007).

3.4.1.5. Remodelage bronchique

Les cysLTs jouent un rôle important dans le remodelage bronchique associé à la réponse asthmatique en promouvant la synthèse de facteurs de croissances (TGFβ, VEGF), protéases (furine, MMP2, MMP9), et composants de la matrice extracellulaire (collagènes, tenascine, laminine) par les cellules immunes ou non des parois des voies aériennes (Asakura *et al.*, 2004; Bosse *et al.*, 2008; Eap *et al.*, 2012; Ichiyama *et al.*, 2007; Perng *et al.*, 2006; Poulin *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2008b; Tokuriki *et al.*, 2007). Notamment, le LTD₄ augmente la production de TGFβ et procollagène-I dans les fibroblastes de patients asthmatiques mais pas de donneurs sains (Eap *et al.*, 2012). De plus, les cysLTs augmentent

la prolifération et la capacité migratoire des fibroblastes et cellules des muscles lisses bronchiques (Panettieri *et al.*, 1998; Parameswaran *et al.*, 2002; Ravasi *et al.*, 2006; Vannella *et al.*, 2007).

3.4.2. Rôle des récepteurs CysLT1 et CysLT2 dans l'asthme

Le récepteur CysLT1 transduit la plupart des propriétés inflammatoires et pathogéniques des cysLTs dans l'asthme. *In vivo*, les souris déficientes pour le récepteur CysLT1 sont réfractaires au développement du phénotype asthmatique (Maekawa *et al.*, 2009). De plus l'administration de Montelukast, antagoniste spécifique de CysLT1, diminue l'éosinophilie, la production des cytokines de type 2 (IL-4, -5, -10 et -13), la production de mucus, l'hyperplasie des muscles lisses et la fibrose dans différents modèles murins d'asthme allergiques (Henderson *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2002; Kiwamoto *et al.*, 2011). Confirmant le rôle de CysLT1 dans la pathologie de l'asthme, des antagonistes spécifiques du récepteur tel que le Montelukast sont approuvés pour usage clinique (Cingi *et al.*, 2015; Marcello et Carlo, 2016; Pizzichini *et al.*, 1999).

Au contraire, le rôle du récepteur CysLT2 dans la pathogenèse de l'asthme est plus controversé. Dans les modèles murins d'asthme allergique provoqués par voie intranasale, la délétion du gène *CYSLT2* ou l'administration de N-méthyl-LTC₄ aggrave le phénotype pathologique associé au récepteur CysLT1 (Barrett *et al.*, 2012). En revanche, dans un modèle de provocation par voie intra-trachéale, un antagoniste de CysLT2 diminuait l'infiltration leucocytaire (Matsuda *et al.*, 2018). Enfin, dans un modèle de cochon d'inde traité avec un inhibiteur de la γ -glutamyl-transférase, l'efficacité d'un antagoniste de CysLT2 était positivement corrélée avec la quantité administrée d'inhibiteur (Sekioka *et al.*, 2017). De plus, à une dose intermédiaire d'inhibiteur, la combinaison d'antagonistes ciblant CysLT1 et CysLT2 montrait une meilleure efficacité que l'administration d'un antagoniste ciblant l'un ou l'autre des récepteurs, reflétant l'implication différentielle des récepteurs dépendamment du ratio de production LTC₄/LTD₄ et le potentiel thérapeutique des antagonistes de CysLT2 (Sekioka *et al.*, 2017). Appuyant ces résultats contradictoires, une étude menée sur des biopsies bronchiques de 2 patients asthmatiques, en présence d'un antagoniste de CysLT2, indiquait une exacerbation pour l'un et une diminution pour l'autre de la contraction induite par l'histamine (Sekioka *et al.*, 2015).

Finalement, confirmant l'implication des cysLTs et de leurs récepteurs dans la pathogenèse de l'asthme, plusieurs polymorphismes associés à l'intolérance à l'aspirine ou à l'hyperréactivité bronchique ont été identifiés dans les gènes codant la 5-LO (Kim *et al.*, 2005), la LTC₄-Synthase (Kawagishi *et al.*, 2002) ou les récepteurs CysLT1 (Kim *et al.*, 2006) et CysLT2 (Park *et al.*, 2005).

4. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

L'IL-33 et les cysLTs sont des composants de l'immunité innée ayant des rôles clés dans la pathogenèse de l'asthme. L'IL-33 a été proposée comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'asthme pour sa capacité à initier le profil inflammatoire de type 2. Néanmoins, son rôle dans la voie d'action des cysLTs a été peu étudiée. Des études précédentes ont montré que les cytokines de type 2, IL-4, IL-5 et IL-13, abondamment secrétées dans la muqueuse bronchique asthmatique, augmentent l'expression du récepteur CysLT1 à la surface des cellules myéloïdes et lymphoïdes, ainsi que la réponse chimiotactique de celles-ci au LTD₄ (Early *et al.*, 2007; Shirasaki *et al.*, 2002; Thivierge *et al.*, 2000; Thivierge *et al.*, 2001; Thivierge *et al.*, 2015). De plus, des résultats préliminaires indiquaient une augmentation de l'expression de CysLT1 dans les lymphocytes périphériques humains au niveau protéique mais pas au niveau de l'ARNm.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'IL-33 augmente l'expression post-transcriptionnelle du récepteur CysLT1 dans les lymphocytes du sang périphérique humain.

Pour vérifier cette hypothèse, deux objectifs ont été explorés :

- 1. Caractériser la réponse à l'IL-33 dans les différentes sous-populations lymphocytaires.**
- 2. Définir à quel niveau post-transcriptionnel l'IL-33 régule l'expression de CysLT1.**

CHAPITRE 1

L'IL-33 AUGMENTE L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR DE TYPE 1 DES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES DANS LES LYMPHOCYTES T CD4⁺ DU SANG PÉRIPHÉRIQUE HUMAIN

*IL-33 upregulates cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression in human
peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes¹*

Marie Boudaud*, Sylvie Turcotte*, Jana Stankova*, Marek Rola-Pleszczynski*

* Service d'immunologie et allergologie, Département de Pédiatrie, Faculté de Médecine et
des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

Article sous presse

The Journal of Immunology

MB a contribué au design de l'étude, à l'acquisition, l'analyse et la mise en forme des
données et à l'écriture du manuscrit. ST a participé à l'acquisition des données. JS et MRP
ont contribué au design de l'étude et à la révision critique du manuscrit.

¹ Supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to JS and MR-P.

Résumé

L'interleukine (IL)-33 et les cystéinyl-leucotriènes (cysLTs) sont des médiateurs clés de la pathogenèse de l'asthme en contribuant à l'initiation et au maintien de l'environnement inflammatoire de type 2. Pourtant, peu d'études se sont intéressées aux potentielles interactions entre leurs voies d'action. Cette étude avait pour but d'explorer la régulation de l'expression des récepteurs aux cysLTs, CysLT1 et CysLT2, par l'IL-33 dans les lymphocytes du sang périphérique humain. Les résultats montrent que l'IL-33 augmente l'expression de CysLT1 mais pas de CysLT2 avec une réponse maximale après 9h de stimulation à une concentration de 5ng/ml. Cette augmentation était observée au niveau protéique, mais pas au niveau transcriptionnel, et était accompagnée par une augmentation du flux calcique et de la chimiotaxie en réponse au LTD₄ dans les lymphocytes T CD4⁺. Pour la première fois, nous montrons que les lymphocytes naïfs purifiés expriment ST2L et répondent à l'IL-33 en absence de stimulation du TCR, suggérant un mécanisme indépendant de la présentation antigénique. Ces résultats contribuent à élargir les connaissances dans le domaine de l'IL-33 en proposant un nouveau mode d'action de la cytokine sur les lymphocytes T et en ajoutant la régulation de la migration cellulaire à la liste de ces propriétés inflammatoires, renforçant son statut de cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement de l'asthme.

Abstract

IL-33 and cysteinyl-leukotrienes (cysLTs) are key components of asthma pathogenesis and both contribute to the initiation and maintenance of the type-2 inflammatory environment. However, little is known about the potential interactions between the two mediators. In this work, we studied the regulation of expression of the cysLT receptors CysLT1 and CysLT2 by IL-33 in human peripheral blood lymphocytes. Our results show that the IL-33/ST2L axis increases CysLT1, but not CysLT2, expression in a concentration- and time-dependent manner in peripheral blood lymphocytes. IL-33-induced CysLT1 upregulation was observed at the protein, but not at the mRNA level, and was accompanied by an increase in LTD₄-induced calcium mobilization and migration of CD4⁺ T lymphocytes. We also show, for the first time, that purified, naïve CD4⁺ T lymphocytes expressed ST2L and responded to IL-33 in the absence of antigen or TCR stimulation, suggesting a mechanism independent of antigen presentation. These results contribute to expand our knowledge in the field of IL-33, by proposing a new mode of action of the cytokine on T cells and by extending its role to the regulation of naïve T cell trafficking, therefore reinforcing its interest as a potential therapeutic target for the treatment of asthma.

Introduction

Asthma is the most widespread chronic disease of the lung (1). Clinical manifestations are defined by wheezing and difficulty in breathing due to reversible airway hyperreactivity and obstruction (2, 3). Asthma is mostly associated with type-2 inflammation characterized by leukocyte infiltration (eosinophils, basophils, mast cells and lymphocytes), type-2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) and IgE production (2, 4). In accordance with these physiological and immunological parameters, several treatments are available such as corticosteroids, beta-adrenergic agonists, leukotriene modifiers or cytokine antagonists. However, they display diverse side effects and are not always effective (5-7). Moreover, although type-2 inflammation and Th2 lymphocytes are well-established key players in most cases of asthma, Th2-low phenotypes exist and are characterised by infiltration of neutrophils and Th17 cells (8, 9). Thus, in the last decades, distinct endotypes of asthma have been described according to their ontogeny, inflammatory profile or treatment response (10, 11). Given this diversity of phenotypes and treatments, epithelial-derived cytokines that are upstream in the ontogeny of the disease have been proposed as new therapeutic targets, one of these being interleukin (IL)-33.

IL-33 is an IL-1 family member constitutively expressed by epithelial and endothelial cells (12, 13). During an asthmatic reaction, it is also released by fibroblasts and airway smooth muscle cells as well as by myeloid cells in response to airway allergens, viruses or tissue damage (14-18). Once processed extracellularly by granulocyte-derived proteases (cathepsin G, elastase, chymase, tryptase) (19-21), the mature cytokine binds to its specific receptor which exists as a soluble form, sST2, and a membrane-associated form, ST2L (12, 14). sST2 acts as a decoy receptor, whereas ST2L dimerizes with the IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) to transduce a signal towards the activation of MAPK (ERK1/2, p38, JNK) and NF- κ B pathways (12, 22, 23). ST2L is expressed at the surface of almost all hematopoietic cells but was soon found to be associated with Th2 lymphocytes and type-2 inflammation (24, 25). Indeed, IL-33 is a chemoattractant for Th2 lymphocytes (26) and its recognition by most cells leads to the release of cytokines, mainly IL-5 and IL-13, driving asthma-associated eosinophilia and epithelial hyperplasia, respectively (12, 27). Thus, IL-33 constitutes a key initiator of the immune profile and the symptoms of asthma (28-30).

Cysteinyl-leukotrienes (cysLTs) are lipid mediators derived from arachidonic acid metabolism and consist of leukotriene (LT) C₄, LTD₄ and LTE₄ (31). They have been initially described as slow-reacting substances of anaphylaxis due to their strong bronchoconstrictive activity (32). CysLTs are also mediators of inflammation and contribute to the asthmatic immune environment as regulators of cytokine expression (33, 34) and as chemotactic agents for leukocytes (35-37). They act via three G-protein-coupled receptors known as CysLT1, CysLT2 and CysLT3, mainly differing by their affinity for their ligands. Thus, CysLT1 (38, 39) and CysLT2 (40, 41) bind in order of affinity LTD₄>LTC₄>>LTE₄ and LTD₄=LTC₄>>LTE₄, respectively. On the contrary, CysLT3/GPR99 has been characterized, more recently, as the preferential receptor for LTE₄, binding LTD₄ and LTC₄ to a lesser extent (42). CysLT1 and CysLT2 are expressed on most leukocytes in different proportions and have been associated with immune regulation by cysLTs. Their expression is regulated by TLR ligands (43) and type-1 (IFN γ) (44) as well as type-2 (IL-4, IL-5, IL-13) (35, 45, 46) cytokines. In accordance, CysLT1 is more expressed on leukocytes during asthma (47).

Interactions between cysLTs and IL-33 are poorly understood. The main studies in the field revealed that IL-33, alone or in combination with TSLP, increases IgE-induced cysLT release in human basophils (48) and cord blood-derived mast cells (49). IL-33 and cysLTs are also known to synergise in ILC2 activation (50, 51). However, to our knowledge, the question whether IL-33 can regulate cysLT receptor expression has never been addressed. Herein, we show that the expression of CysLT1, but not CysLT2, is upregulated by IL-33 in a ST2L-dependent manner in human naïve as well as memory peripheral blood T cells. For the first time, naïve T cells are reported to respond directly and to the same extent as memory T cells to IL-33 stimulation by increasing CysLT1 expression, in absence of TCR activation.

Materials and Methods

Reagents

Recombinant human IL-33 was purchased from Peprotech (Rocky Hill, New Jersey). The following antibodies were used for flow cytometry labelling: rabbit anti-human CysLT1 (intracellular) and CysLT2 receptor polyclonal antibodies (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) and corresponding rabbit IgG isotype (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama), Cy5-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania), AF488-conjugated chicken anti-rabbit IgG (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, Oregon), goat anti-human CysLT1 (extracellular; gift from Merck & Co, Kenilworth, New Jersey), AF488-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania), conjugated mouse anti-human CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD45RA and CD45RO antibodies (BD Pharmingen, San Diego, California). The following antibodies were used for western blot analysis: mouse anti-phospho-ERK (sc7383), mouse anti-phospho-JNK (sc6253), rabbit anti-ERK (sc93), rabbit anti-JNK (sc571), rabbit anti-p65 (sc372), rabbit anti-p38 (sc535) and HRP-linked donkey anti-goat IgG (sc2020) were from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, California), rabbit anti-phospho-p65 (3031S), rabbit anti-phospho-p38 (9211S), rabbit anti-phospho-p70S6K (108D2), rabbit anti-p70S6K (9202), rabbit anti-phospho-eIF4B (#3591S), rabbit anti-eIF4B (3592), rabbit anti-phospho-eIF4E (9741), rabbit anti-eIF4E (2067), HRP-linked goat anti-rabbit IgG (7074) and HRP-linked horse anti-mouse IgG (7076P2) were from Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts). LTD₄, LTC₄ and LTE₄ were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) was from PeproTech (Montréal, Québec). Fluo-3, used for the monitoring of the levels of cytosolic free calcium, was from Molecular Probes (Eugene, Oregon). Goat anti-human ST2L and corresponding goat IgG isotype were provided by R&D Systems (Minneapolis, Minnesota) and were used at the concentration of 0.75µg/ml as blocking antibodies or at 0.4µg/ml for western blot analysis. The following signaling pathway inhibitors were used: MEK-1 inhibitor PD98059 (10µM, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan), p38 inhibitor SB203580 (10µM, Calbiochem, San Diego, California) and JNK inhibitor SP600125 (5µM, Calbiochem, San Diego, California), Ca²⁺ chelator BAPTA-AM (10µM, Biomol® Research

Laboratories Inc., Plymouth Meeting, Pennsylvania), mTOR inhibitor Rapamycin (100nM, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan), PI3K inhibitor Wortmannin (200nM, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan) and TAK-1 inhibitor (5Z)-7-Oxozeanol (1μM, Calbiochem, San Diego, California).

Isolation and stimulation of human lymphocytes

Human peripheral blood lymphocytes were obtained from healthy volunteers following informed consent in accordance with the guidelines of the World Medical Association's Declaration of Helsinki and with the approval of the institutional ethics review board. Peripheral blood mononuclear cells were purified by dextran sedimentation for 20min, followed by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque® (GE Healthcare Life Sciences, Canada) at 1400rpm for 20min. Cells at the interface were washed twice with PBS and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100U/ml penicillin, and 100μg/ml streptomycin. Monocytes were allowed to adhere to plastic petri dishes coated with defibrinized autologous serum for 90min at 37°C and 5% CO₂. Non-adherent lymphocytes were then resuspended in culture medium (RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated FBS, 100U/ml penicillin, and 100μg/ml streptomycin). Where indicated, CD4⁺ T cells and naïve CD4⁺ T cells were purified with EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit and EasySep™ Human Naïve CD4⁺ T Cell Enrichment Kit, respectively (StemCell™ Technologies, Vancouver, British Columbia). Alternatively, naïve cells were sorted from enriched CD4⁺ T cells using a BD FACSaria™ III (BD Pharmingen, San Diego, California). Finally, enriched lymphocytes and purified cells were incubated overnight in non-tissue culture-treated petri dishes. The next day, cells were resuspended at 4e6 cell/ml in fresh culture medium and stimulated in non-tissue culture-treated plates. For protein analysis, cells were stimulated with indicated concentrations of IL-33 for 9h. Kinetic experiments were performed with 5ng/ml of IL-33. Where mentioned, cells were pre-incubated 15min at 37°C with blocking antibodies or pharmacological inhibitors before stimulation with 5ng/ml of IL-33 for 9h.

RNA extraction, Reverse Transcription and PCR

Eight million cells were lysed in 1 ml TRIzol® Reagent (Life Technologies, Burlington, Ontario) and frozen at -80°C until RNA extraction. RNAs were extracted by addition of chloroform following Life Technologies recommendations. One microgram RNA was reverse transcribed with QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Toronto, Ontario) following manufacturer's instructions and in the presence of 20UI RNase OUT (Invitrogen, ThermoFisher). CysLT1 and CysLT2 mRNA levels were quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). cDNA was amplified with Taq polymerase in recommended conditions (Feldan Bio, Québec, Québec). Five minutes of denaturation at 95°C were followed by 32 cycles of amplification: 30s at 95°C, 30s at 58°C and 30s at 72°C. The change of CysLT1 and CysLT2 (gene of interest: G.O.I) transcript levels, after stimulation and relative to control conditions, were determined by normalisation with the housekeeping gene (HK.G) RPL13A using the following formula: $\Delta\Delta Ct = [(Ct\ G.O.I_{Ctl} - Ct\ HK.G_{Ctl}) - (Ct\ G.O.I_{STIM.} - Ct\ HK.G_{STIM.})]$. ST2L mRNA expression was detected by PCR. Complementary DNA was amplified with the *Taq* PCR Master Mix Kit (QIAGEN, Toronto, Ontario). Five minutes of denaturation at 95°C were followed by 40 or 20 cycles of amplification for ST2L and RPL13A, respectively (30s at 95°C, 30s at 58°C and 30s at 72°C). PCR products were then migrated on a 2% agarose gel. The following primers were used (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa): CysLT1: forward, 5'-CCTCAGCACCTATGCTTTGT-3' and reverse, 5'-ATTGTCTTGTGGGGGCTCAA-3'; CysLT2: forward, 5'-AGACTGCATAAAGCTTTGGTTATC-3' and reverse 5'-ATACTCTTGTTTCCTTTCTCAACC-3', RPL13A: forward, 5'-GTGCGTCTGAAGCCTACAAG-3' and reverse, 5'-TCTTCTCCACGTTCTTCTCG-3'; ST2L: forward, 5'-GAACGACGCCAAGGTGATAC-3' and reverse, 5'-CAGGCATTTGGTACCTCACG-3'.

Flow cytometry measurement of cysLT receptor expression

Cells were washed with PBS, fixed for 15min with 2% paraformaldehyde, permeabilized for 15min with 0.1% Saponin and resuspended in PBS-2% BSA at room temperature for labeling. After blocking for 15min with 1mg/ml human IgG, lymphocytes were incubated for another 15min with conjugated mouse anti-human CD4 or CD8 or CD19

or CD56, and CD3 antibodies. Cells were then washed with PBS and incubated for 30min with optimized concentrations of rabbit IgG isotype or rabbit anti-human CysLT1 or CysLT2 primary antibodies. After washing with PBS, cells were incubated for 30min with AF488-conjugated chicken or Cy5-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody. Finally, cells were washed twice with PBS before acquisition and analysis on a CytoFLEX flow cytometer with the CytExpert software (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario), as shown in Figure S1.

Western blot analysis

Eight million lymphocytes were lysed in 50µl RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing cOmplete, Mini EDTA-free protease inhibitor tablet (Roche, MilliporeSigma Canada Co., Oakville, Ontario) and supplemented with aprotinin, leupeptin, pepstatin, PMSF, NaF and Na₃VO₄. Cells were lysed 30min on ice and centrifuged 30min at 13000rpm, 4°C. Supernatants were frozen at -80°C until analysis. Lysates were thawed on ice before addition of laemmli buffer 5x (50% glycerol, 312.5mM Tris-HCl pH 6.8, 25% β-mercapto-ethanol, 10% SDS, Bromophenol Blue). Samples were heated 3min at 100°C or 45min at 37°C for signaling pathway and ST2L expression analysis, respectively. Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond, GE). Membranes were blocked 30min with Tris-buffer saline containing 0,05% Tween (TBS-T) and 5% milk (TBS-T-milk) before an overnight incubation at 4°C with a primary antibody in TBS-T-milk or TBS-T containing 5% BSA for phospho-targeting antibodies. Membranes were washed 3x15min in TBS-T, incubated for 45min in the appropriate HRP-conjugated secondary antibody and washed again 3x15min in TBS. Protein expression was revealed by ECL chemiluminescence (GE Healthcare Life Sciences, Canada) with a Chemidoc™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Canada) and analyzed with ImageLab software (Bio-Rad).

Flow cytometry measurement of the levels of cytosolic free calcium

Lymphocytes were labeled with mouse anti-human CD3 (APC) and CD4 (PE) or CD8 (PE) or CD19 (PE) antibodies and loaded with 3µM Fluo-3 for 30min, in darkness, at 4e6 cells/ml in Ca²⁺-free HBSS buffered with 0.35g/ml NaHCO₃ and 0.01M Hepes. Cells were

washed and resuspended in HBSS containing 2mM CaCl₂. Intracellular calcium influx in response to 10⁻⁷M LTD₄, LTC₄, LTE₄ or 5ng/ml SDF-1 was studied on a FACSCALIBUR cytometer (BD BioSciences, Franklin Lakes, New Jersey) and results were analysed with the FlowJo software (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon). Baseline fluorescence was acquired for 15sec and calcium response was acquired for 40sec for each sample. For quantification, calcium peak fluorescence intensity in IL-33-stimulated cells was compared to calcium peak fluorescence intensity in non-stimulated cells.

Chemotaxis assay in Boyden chambers

Lymphocytes were washed with PBS and incubated for 20min at room temperature with mouse anti-CD8 (FITC), anti-CD4 (PE) and anti-CD3 (APC) antibodies in PBS-2% BSA. Cells were washed again with PBS and resuspended at 3e6 cell/ml in culture medium. The lower chamber of Boyden chambers was filled with culture medium containing LTD₄ and separated with a 5µm pore membrane from the upper chamber filled with 200 µl of cell suspension. After 2h of migration at 37°C, cells remaining in the upper chamber and the membrane were removed and migrated cells in the lower chambers was quantified as the number of gated events acquired in 30sec using a FACSCALIBUR cytometer and the CellQuest Pro software (BD BioSciences, Franklin Lakes, New Jersey). The chemotaxis index was defined as the number of migrated cells in presence of the chemoattractant divided by the number of migrated cells in the absence of chemoattractant.

ST2L expression in HEK-293 cells

HEK-293 cells were cultured in DMEM containing 5% FBS and seeded in 6 well plates. When confluence reached 50%, cells were transfected with a ST2L-encoding vector (GenScript USA Inc., Piscataway, New Jersey) or the empty pcDNA3 vector, using the transfection agent TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin). Forty-eight hours later, cells were lysed with 100µl RIPA lysis buffer and processed for SDS-PAGE analysis as described above.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The number n corresponds to independent experiments with cells from different donors. One-way and two-way ANOVA were used for comparison following one and two variables, respectively. Dunnett's multiple post test was performed to compare stimulated conditions versus a common non-stimulated control. Sidak's multiple post test was used to compare selected pairs of conditions. Paired t-test was used to compare two conditions to each other. Statistical significance was assumed when $p < 0.05$.

Results

IL-33/ST2L axis increases CysLT1 protein expression in human peripheral blood lymphocytes

The regulation of CysLT1 and CysLT2 receptor expression by IL-33 was first explored in enriched human peripheral blood lymphocytes at the mRNA level by qPCR and at the protein level by flow cytometry. As shown in Figure 1A and 1B, IL-33 increased CysLT1 protein expression in a concentration and time-dependent manner, respectively. This upregulation reached a maximum of 200 % with 5ng/ml after 9h and then decreased to 125% after 12h (Fig. 1, A and B). By contrast, kinetics of mRNA levels upon stimulation with 5ng/ml of IL-33 did not reveal any modulation of CysLT1 transcripts (Fig. 1, C). Furthermore, CysLT2 expression was not affected by the treatment at either the protein or the transcript level (Fig. 1, D-F). Thus, IL-33 increased CysLT1 but not CysLT2 expression at the protein level in human peripheral blood lymphocytes.

ST2L is the only known receptor for IL-33. Its involvement in IL-33-induced CysLT1 upregulation was confirmed using a ST2L-specific blocking antibody. As shown in Figure 2, IL-33-induced increase in CysLT1 expression was abolished in the presence of the ST2L-specific blocking antibody in peripheral blood lymphocytes, whereas it was maintained in the presence of the isotopic control antibody. This result confirms that IL-33 increased CysLT1 expression in peripheral blood lymphocytes through ST2L signaling.

ST2L has been shown to signal through NF- κ B and MAPKs pathways in several cell types (12, 48). As shown in Figure 3A, IL-33 induced p38 phosphorylation in peripheral blood lymphocytes after 15 and 30min of stimulation. On the contrary, neither p65, nor ERK or JNK were significantly phosphorylated after IL-33 stimulation (Fig. 3, A). Furthermore, IL-33 can activate cytokine translation through the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway in ILC2s, lymphatic endothelial cells and bone marrow-derived DCs (52-54). Thus, we explored the phosphorylation of p70S6K and the translation initiation factors eIF4B and eIF4E (Fig. 3, B). Depending on donors, p70S6K was phosphorylated after 60 or 90min of stimulation. Moreover, although eIF4B phosphorylation was not significantly affected, eIF4E phosphorylation was markedly increased at 90min (Fig. 3, B).

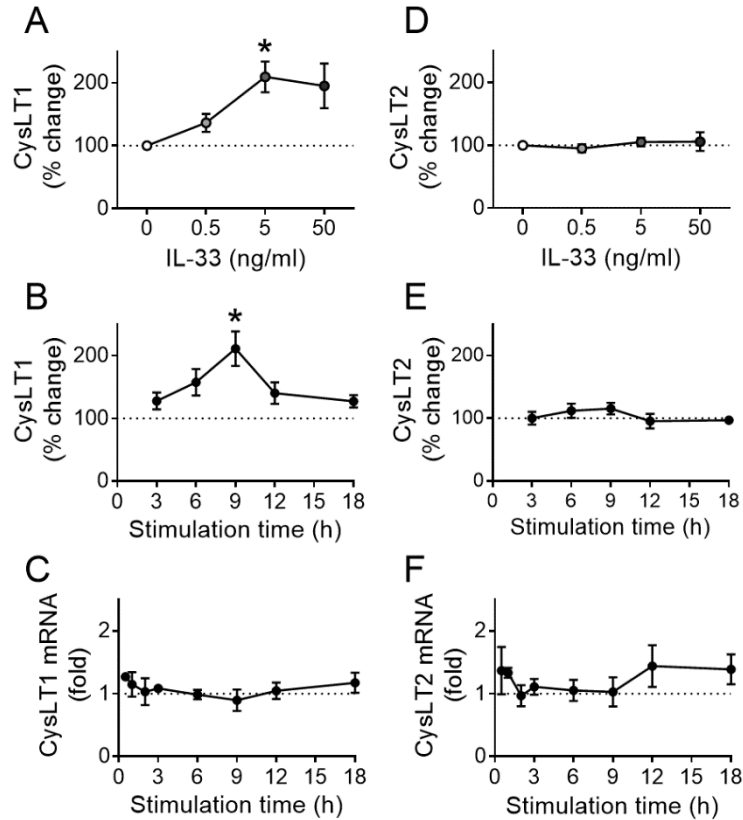


Figure 1. CysLT1 and CysLT2 mRNA and protein expression in human peripheral blood lymphocytes stimulated with IL-33. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h (A and D) or with 5ng/ml for indicated times (B-C and E-F). CysLT1 (A-C) and CysLT2 (D-F) protein expression was measured by flow cytometry (A-B and D-E) and mRNA levels were quantified by qPCR (C and F). Data are presented as mean±SEM. * $p < 0.05$ versus untreated condition, one-way ANOVA, Dunnett's posttest. (A-B) $n = 6$. (C-D) $n = 7$. (E-F) $n = 4$.

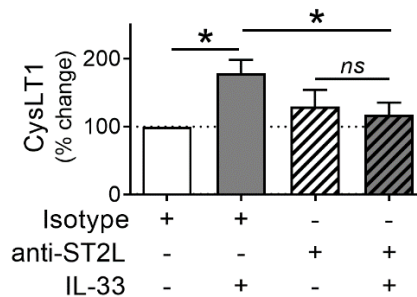


Figure 2. Involvement of ST2L in IL-33-induced expression of CysLT1. Enriched peripheral blood lymphocytes were incubated for 15 min with 0.75μg/ml isotopic control or ST2L-specific blocking antibody and stimulated with 5ng/ml IL-33 for 9h. CysLT1 expression was measured by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. * $p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey's posttest, $n = 6$.

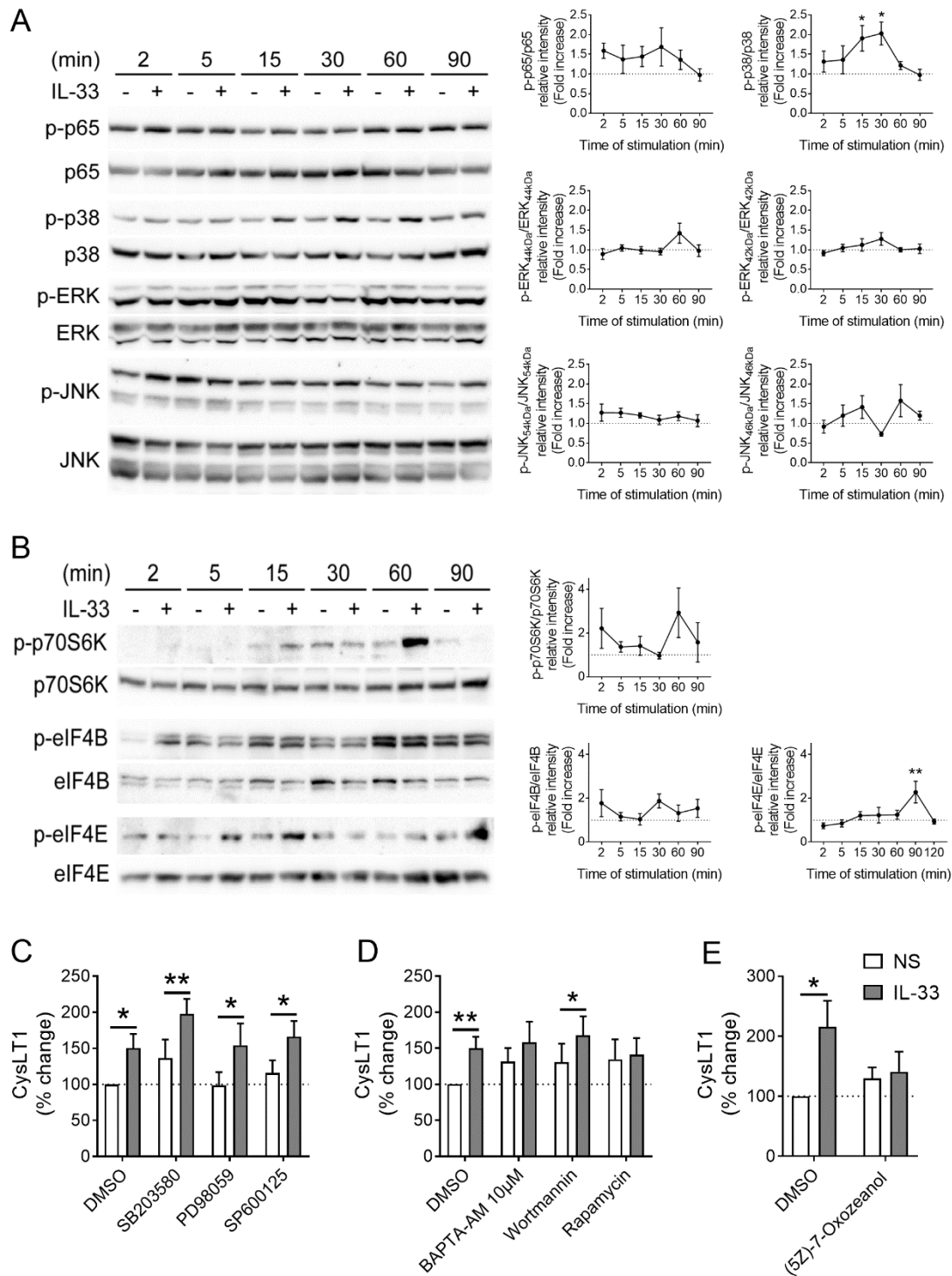


Figure 3. Involvement of mTOR and TAK-1 pathways in IL-33-induced expression of CysLT1. (A and B) Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with 50ng/ml IL-33 for indicated times and lysed in RIPA buffer. SDS-PAGE and western blots were performed as described in *Materials and Methods*. One representative experiment is shown on the left and quantifications of multiple experiments are compiled in graphs on the right. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Dunnett's

posttest, n=5-9. (C-E) Enriched peripheral blood lymphocytes were incubated for 15min before a 9h-stimulation with 5ng/ml IL-33 and CysLT1 expression was analysed by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05, **p<0.01, two-way ANOVA, Sidak's posttest, n=6 (C), n=8-9 (D), n=5 (E).

To elucidate the role of these pathways in IL-33-induced CysLT1 expression, peripheral blood lymphocytes were stimulated with 5ng/ml of IL-33 in the presence of DMSO (vehicle), PD98059 (MEK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), BAPTA-AM (Ca²⁺ chelator), Wortmannin (PI3K inhibitor) or Rapamycin (mTOR inhibitor; Fig. 3, C and D). None of the MAPK inhibitors blocked IL-33-induced upregulation of CysLT1 (Fig. 3, C). Ca²⁺ chelator and rapamycin reduced it to different extent, depending on donors, while wortmannin had no effect (Fig. 3, D). Finally, TAK-1 was shown to be activated upstream in ST2L signaling cascade in human monocytes (55) and a TAK-1 inhibitor, (5Z)-7-Oxozeanol, completely inhibited IL-33-mediated upregulation of CysLT1 (Fig. 3, E). Altogether, these results suggest that IL-33-increased CysLT1 expression was independent of MAPK pathways but required TAK-1 activation and partially involved calcium and mTOR signaling pathways.

IL-33 increases CysLT1 protein expression in peripheral blood T, B and NK lymphocytes

To determine whether IL-33 targets specific lymphocyte sub-populations, cells were stimulated as mentioned above, and CysLT1 protein expression was determined in gated CD3⁺ and CD3⁻ cells by flow cytometry (Fig. S1). IL-33 increased CysLT1 protein levels in both CD3⁺ and CD3⁻ lymphocytes in a concentration and time-dependent manner (Fig. 4, A and B respectively). IL-33-induced expression of CysLT1 was higher in CD3⁺ than in CD3⁻ cells, reaching a maximum of 230% and 150%, respectively, at 9h of stimulation with 5ng/ml of the cytokine (Fig. 4, A and B) and was confirmed in non-permeabilized CD3⁺ cells, using a specific antibody for the extracellular N-terminal tail of CysLT1 (Fig. S3). Among T lymphocytes, CD4⁺ and CD4⁻ cells responded to the same extent to IL-33 (Fig. 4, C and D). The same profile was observed with CD8⁺ and CD8⁻ cells (Fig. S2). Among CD3⁻ cells, B and NK cells also displayed a concentration-dependent increase of CysLT1 expression in response to IL-33, reaching a maximum of 190% and 145%, respectively, at 5ng/ml (Fig. S4, A and B).

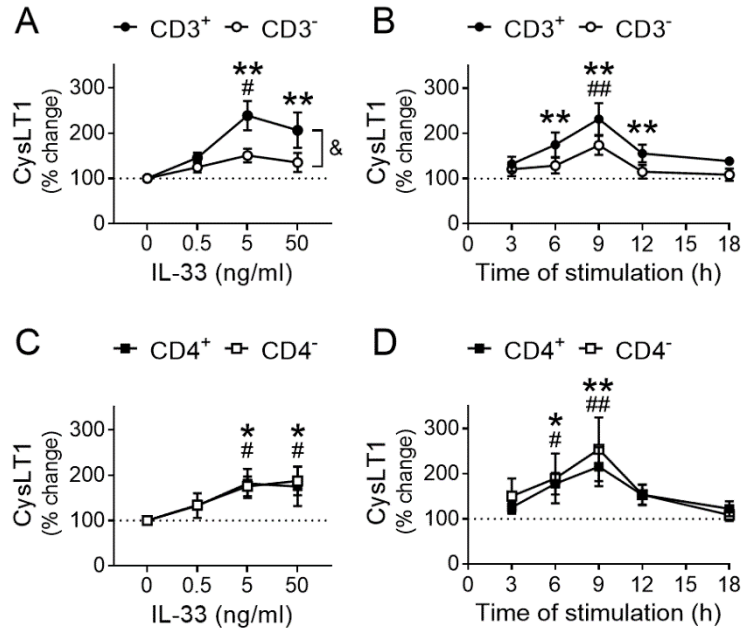


Figure 4. Modulation of CysLT1 expression in lymphocyte sub-populations after IL-33 stimulation. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h (A and C) or with 5ng/ml for indicated times (B and D). CysLT1 expression was measured by flow cytometry in CD3⁺ and CD3⁻ (A and B) or CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD4⁻ cells (C and D). Data are presented as mean \pm SEM. (A and B) ** p <0.001 versus untreated condition in CD3⁺ cells; # p <0.05, ## p <0.001 versus untreated condition in CD3⁻ cells; & p <0.05 between CD3⁺ and CD3⁻ cells; two-way ANOVA, Sidak's posttest; (A) n =9; (B) n =7. (C and D) * p <0.05, ** p <0.01 versus untreated condition in CD3⁺CD4⁺ cells; # p <0.05, ## p <0.01 versus untreated condition in CD3⁺CD4⁻ cells; two-way ANOVA, Sidak's posttest; (C) n =7; (D) n =6.

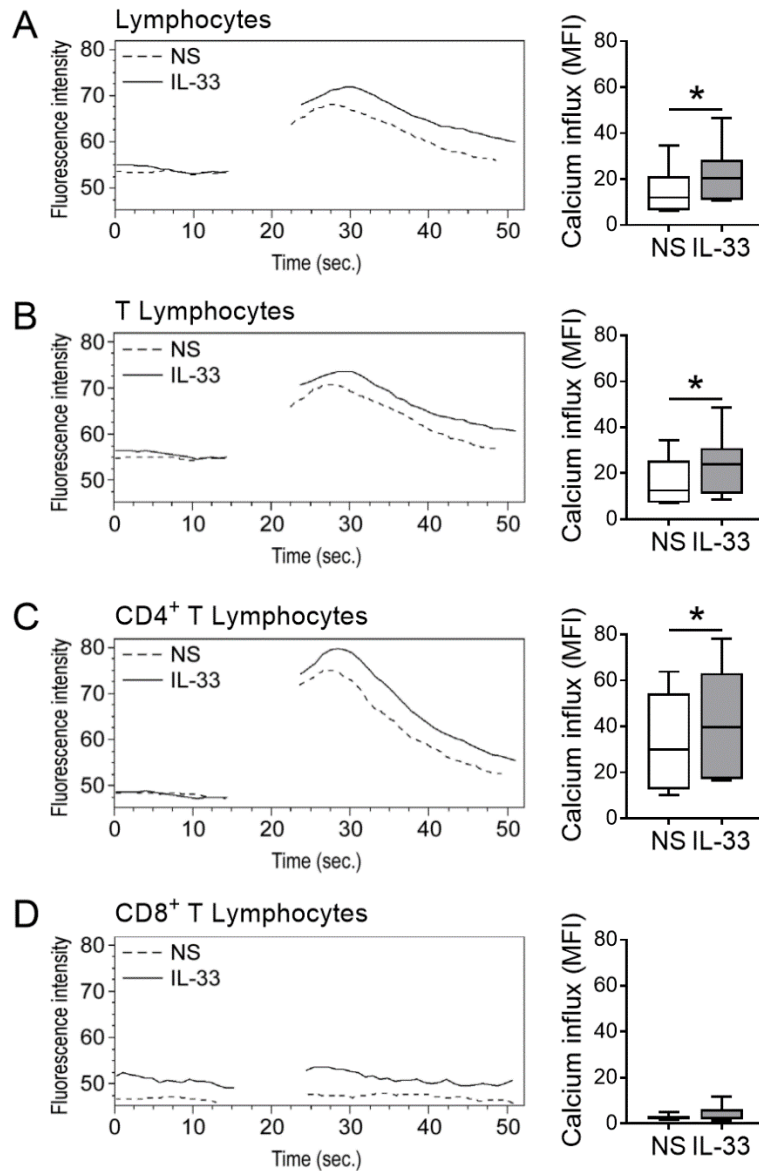


Figure 5. Modulation of LTD₄-induced intracellular calcium mobilisation by IL-33 in lymphocytes. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with 5ng/ml IL-33 for 9h and LTD₄-induced calcium influx was assessed by flow cytometry in whole lymphocytes (A), CD3⁺ (B), CD3⁺CD4⁺ (C) and CD3⁺CD8⁺ (D) cells. For each population, one representative calcium influx kinetic curve in unstimulated (dotted line) and IL-33-stimulated (black line) cells is shown and maximal peak intensity of curves from 6 independent experiments is compiled in graphs. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05, ratio paired t-test.

IL-33 increases LTD₄-induced intracellular calcium influx and migration in CD4⁺ T lymphocytes

LTD₄ is the preferential ligand for CysLT1 and is known to induce an intracellular calcium influx upon binding to its receptor in the majority of cell types examined (37, 46). Thus, to confirm the functional relevance of CysLT1 upregulation, LTD₄-induced calcium influx was quantified by flow cytometry in gated lymphocyte sub-populations 9h after stimulation with IL-33 (Fig. 5 and S5). Total lymphocytes and CD3⁺ lymphocytes displayed enhanced calcium influx after IL-33 treatment (Fig. 5, A and B). As expected, LTC₄ induced a small calcium influx in CD3⁺ lymphocytes that was also increased in IL-33-treated cells, whereas LTE₄-induced calcium response was not detected (Fig. S6, A and B). On the contrary, SDF-1-induced calcium influx was easily detected in CD3⁺ cells but was not increased by IL-33 (Fig. S6, C), supporting a selective targeting of CysLT1 by the cytokine. When we focussed on CD4⁺ and CD8⁺ sub-populations, only CD4⁺ T cells showed a higher response to LTD₄ after IL-33 pre-stimulation (Fig. 5, C). Interestingly, CD8⁺ T cells did not show any calcium influx in response to LTD₄, at steady state, as well as after IL-33 treatment (Fig. 5, D), in spite of increased CysLT1 expression. Thus, IL-33 upregulated CysLT1 protein expression in T lymphocytes which was accompanied by an increased LTD₄-induced calcium influx in CD4⁺ cells. Among non-T cells, B and NK cells also displayed enhanced calcium influx when stimulated with IL-33 (Fig. S4, C and D, respectively).

CysLT1 has been shown to mediate cysLT-induced chemotaxis in T lymphocytes (37). Thus, we examined whether IL-33 could increase lymphocyte migration toward LTD₄ as a functional consequence of the upregulation of CysLT1 expression. After a 9h-stimulation, the chemotactic index of IL-33-treated and untreated lymphocytes was evaluated in Boyden chambers (Fig. 6 and S7). The chemotaxis index increased in a concentration-dependent manner to reach a maximum of 1.51 and 1.65 at 10⁻⁷M LTD₄ in non-stimulated and IL-33-stimulated cells, respectively (Fig. 6, A). The migration rate was significantly higher in IL-33-treated cells when challenged with 10⁻⁸M LTD₄ (1.34 and 1.60 for non-stimulated and IL-33-stimulated cells, respectively), so we explored the migratory response of T lymphocyte subpopulations at this concentration. Consistent with a greater LTD₄-induced calcium influx in CD3⁺CD4⁺ cells, LTD₄-induced migration was increased significantly by IL-33 treatment in CD3⁺CD4⁺ but not in CD3⁺CD8⁺ cells (Fig. 6, B). Since IL-33 has been

shown to stimulate T cell migration (26), we examined the chemokinesis of IL-33-stimulated lymphocytes, in absence of chemo-attractant (Fig. 6, C). The number of migrated cells for each population was not affected by the pre-treatment with IL-33 (Fig. 6, C), excluding an IL-33-induced chemokinesis and supporting a LTD₄-induced migration.

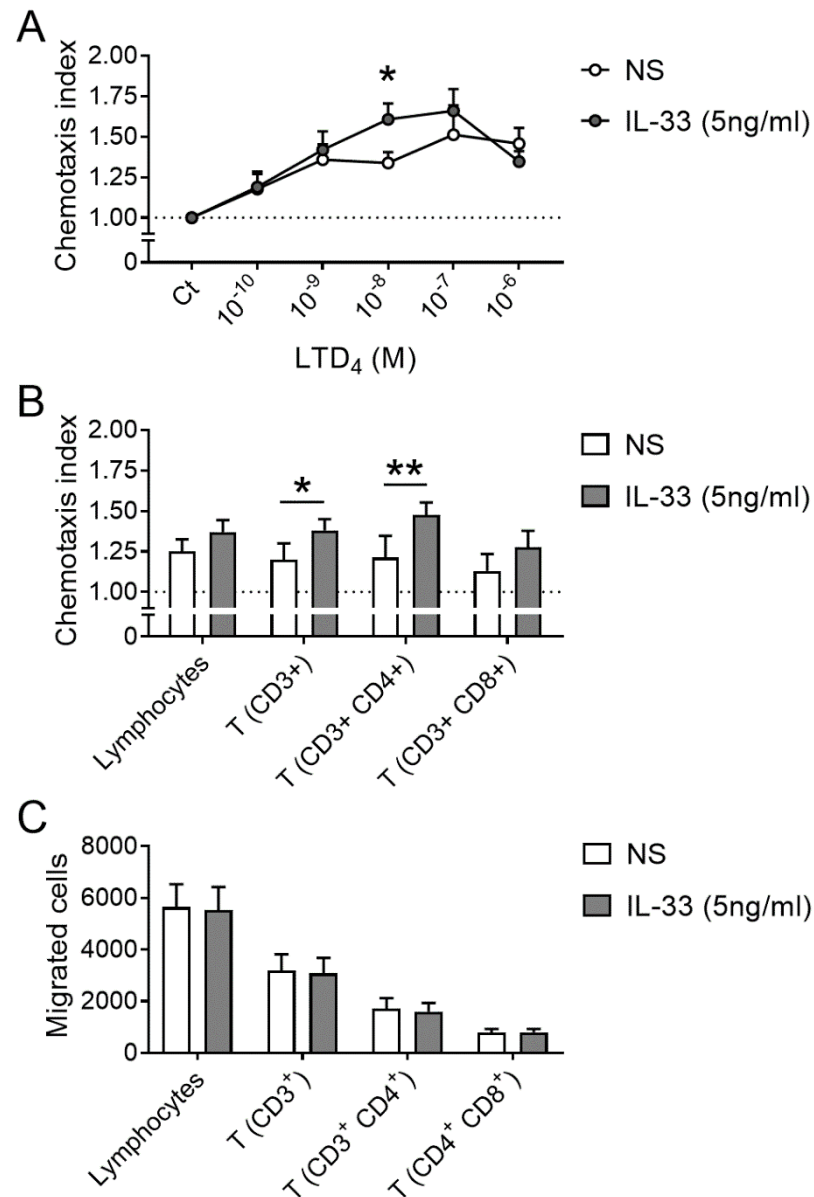


Figure 6. Modulation of LTD₄-induced T lymphocyte migration by IL-33. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with 5ng/ml IL-33 for 9h. (A). Non-stimulated (NS) and IL-33-stimulated cells were allowed to migrate toward increasing concentration of LTD₄ in Boyden Chambers and migration was quantified by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05, Two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n=4. (B) Cells were labeled with lineage-specific antibodies before migration toward 10⁻⁸M LTD₄.

Data are presented as mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01, Two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n =4. (C) Non-stimulated (NS) and IL-33-stimulated cells were labeled with lineage-specific antibodies before migration assay in absence of chemo-attractant. Data are presented as mean \pm SEM, n =8.

LTD₄-induced calcium influx and migration were also performed after 24h of stimulation. Despite the decrease of total CysLT1 protein expression after 12h of IL-33 stimulation (Fig. 3, B and D), both functions of the receptor were still enhanced in IL-33-treated cells after 24h of stimulation (Fig. 7, A and B, respectively). Similarly to what we found at 9h, the increase was greater in CD4⁺ T cells.

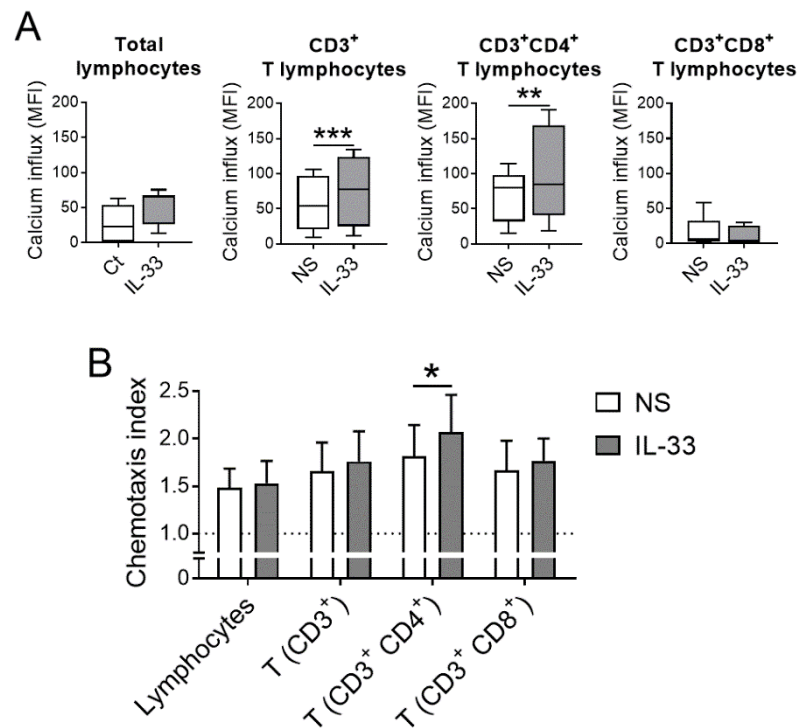


Figure 7. Modulation of LTD₄-induced calcium influx and migration in T lymphocytes after a 24h-treatment with IL-33. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with 5ng/ml IL-33 for 24h. Non-stimulated (NS) and IL-33-stimulated cells were labeled with lineage-specific antibodies. (A) LTD₄-induced calcium influx was assessed by flow cytometry. Data are presented as mean \pm SEM. *** p <0.001, ** p <0.01, ratio paired t-test, n =7. (B) LTD₄-induced migration was assessed in Boyden chambers and migration was quantified by flow cytometry. Data are presented as mean \pm SEM. * p <0.05, two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n =8.

IL-33 acts directly on CD4⁺ T lymphocytes

To determine whether IL-33 action on CD4⁺ T lymphocytes was dependent on antigen-presenting cells, CD4⁺ cells were purified by negative selection and depletion of monocytes/macrophages and B lymphocytes was validated by flow cytometry (Fig. S8). Enriched cells were stimulated for 9h with increasing concentrations of IL-33 before analysis of CysLT1 expression and function, as previously described (Fig. 8). IL-33 augmented CysLT1 protein expression in a concentration-dependent manner, with a maximum increase of 200% at 5ng/ml (Fig. 8, A), whereas transcript levels were not affected (Fig. 8, B). Furthermore, LTD₄-induced migration was increased when cells were treated with 5ng/ml of IL-33 (Fig. 8, C). These results strongly support that IL-33 targets CD4⁺ T lymphocytes independently of antigen-presenting cells to upregulate CysLT1 protein expression and functions.

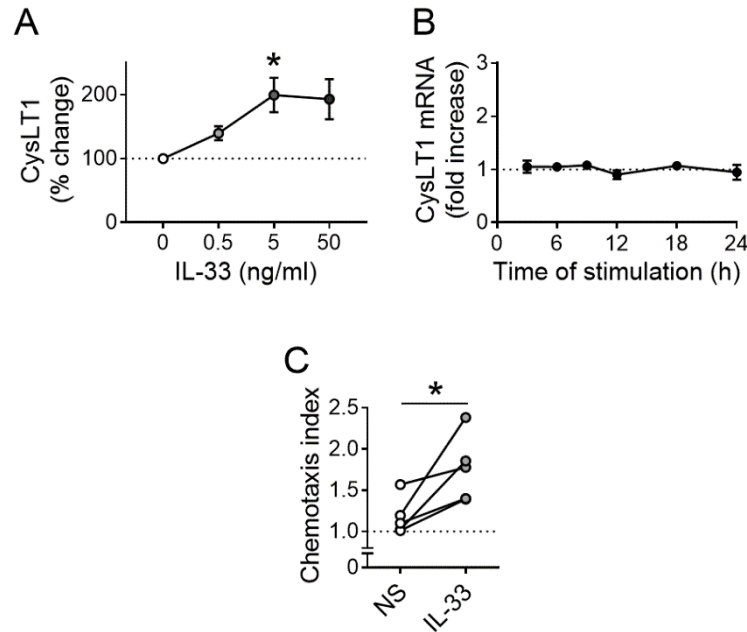


Figure 8. Modulation of CysLT1 expression by IL-33 in enriched CD4⁺ T cells. (A) Enriched CD4⁺ cells were stimulated with indicated concentrations of IL-33 for 9h and CysLT1 protein expression was measured by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05 versus untreated condition, one-way ANOVA, Dunnett's posttest, n=8. (B) Cells were stimulated with 5ng/ml for indicated times and CysLT1 mRNA levels were quantified by RT-PCR. Data are presented as mean±SEM, n=5. (C) Enriched CD4⁺ cells were stimulated with 5ng/ml IL-33 for 9h. LTD₄-induced chemotaxis was performed in Boyden chambers and quantified by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05, paired t-test, n=5.

Both naïve and memory CD4⁺ T cells respond to IL-33

Among peripheral blood T lymphocytes, memory Th2 cells have been described to be more sensitive to IL-33 (12, 56, 57). Thus, we stimulated enriched CD4⁺ T cells with IL-33 and labeled them with anti-CD45RA and anti-CD45RO antibodies to explore CysLT1 expression and LTD₄-induced chemotaxis in naïve and memory cells, respectively. Surprisingly, both cell populations responded to IL-33 to the same extent, with a maximal increase at 5ng/ml (Fig. 9, A), and LTD₄-induced migration was increased in IL-33-treated cells (Fig. 9, B and S9). To verify the ability of naïve T cells to respond directly to IL-33, we first studied the upregulation of CysLT1 expression in CD4⁺CD45RA⁺ cells purified by negative selection (Fig. S10, A). As shown in Figure 9C, purified naïve CD4⁺CD45RA⁺ T cells, as well as positively selected CD4⁺CD45RA⁻ cells, increased CysLT1 expression in response to IL-33. We further confirmed naïve cell responsiveness to IL-33 with sorted cells. Again, 99% purified CD4⁺CD45RA⁺ cells displayed enhanced CysLT1 expression in response to 5 ng/ml of IL-33 (Fig. 9, D and S10, B).

ST2L expression by T cells has been well studied (58). However, it has never been detected at the protein level in naïve T cells (58-60). Thus, we first investigated ST2L expression at the mRNA level by PCR. Purified CD4⁺ T cells and positively selected CD4⁺CD45RA⁻ cells were used for comparison. Although ST2L mRNA levels were slightly lower in naïve CD45RA⁺ cells compared to CD45RA⁻ or whole CD4⁺ T cells, it was easily detected (Fig. 10, A). Furthermore, we performed ST2L immunoblotting of cell lysates from CD4⁺ and sorted CD4⁺CD45RA⁺ cells (Fig. 10, B). As controls, HEK-293 cells were transfected with empty or ST2L-encoding vectors. Although several non-specific bands were revealed with ST2L-deficient HEK-293 with the antibodies used (Fig. 10, B, lane 1), two bands appeared between 75 and 100kDa in ST2L-overexpressing HEK-293 lysates (Fig. 10, B, lane 2). These bands were also present in CD4⁺ and CD4⁺CD45RA⁺ cells samples (Fig. 10, B, lane 3 and 4, respectively). Notably, large amounts of lymphocyte proteins (5e6 cell equivalent) were required to detect a signal, indicating a weak expression of the receptor. Nevertheless, these results confirm that naïve CD4⁺ T cells express ST2L protein and can directly respond to IL-33.

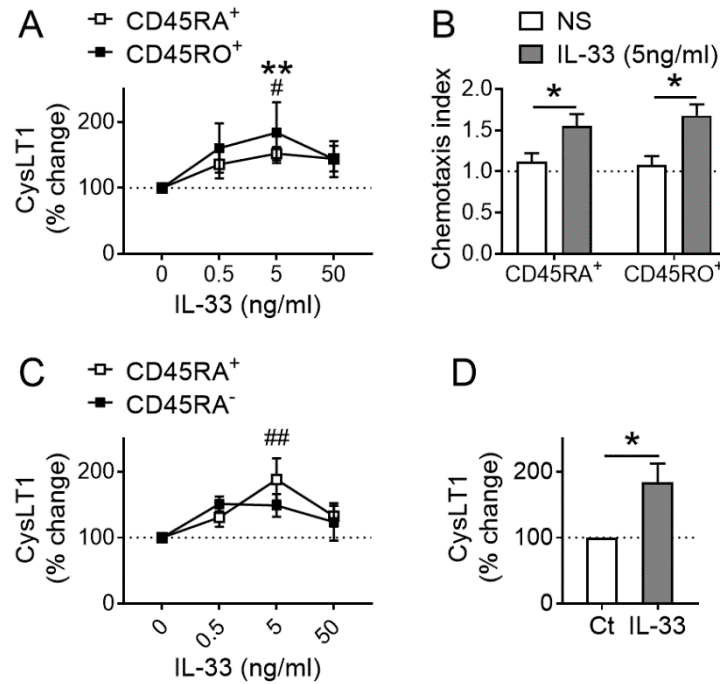


Figure 9. Modulation of CysLT1 expression by IL-33 in naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes. (A) Enriched CD4⁺ lymphocytes were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h and CysLT1 expression was measured by flow cytometry in gated naïve CD45RA⁺ (open squares) and memory CD45RO⁺ (black squares) cells. Data are presented as mean±SEM. **p<0.01 versus untreated condition in CD54RO⁺ cells, #p<0.05 versus untreated condition in CD45RA⁺ cells, two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n=7. (B) Enriched CD4⁺ lymphocytes were stimulated with 5ng/ml of IL-33 for 9h. Cells were then labeled with CD45RA and CD45RO specific antibodies before migration toward 10⁻⁸M LTD₄. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05 versus untreated condition, two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n=4 (C) CD45RA⁺ cells were purified by negative selection from freshly enriched CD4⁺ lymphocytes. Negatively (CD45RA⁻) and positively (CD45RA⁺) selected cells were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h and CysLT1 expression was measured by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. ###p<0.01 versus untreated condition in CD45RA⁺ cells, two-way ANOVA, Sidak's multiple posttest, n=5. (D) CD4⁺CD45RA⁺ cells were sorted from enriched CD4⁺ lymphocytes and stimulated for 9h with 5ng/ml IL-33. CysLT1 expression was measured by flow cytometry. Data are presented as mean±SEM. *p<0.05, paired t-test, n=5.

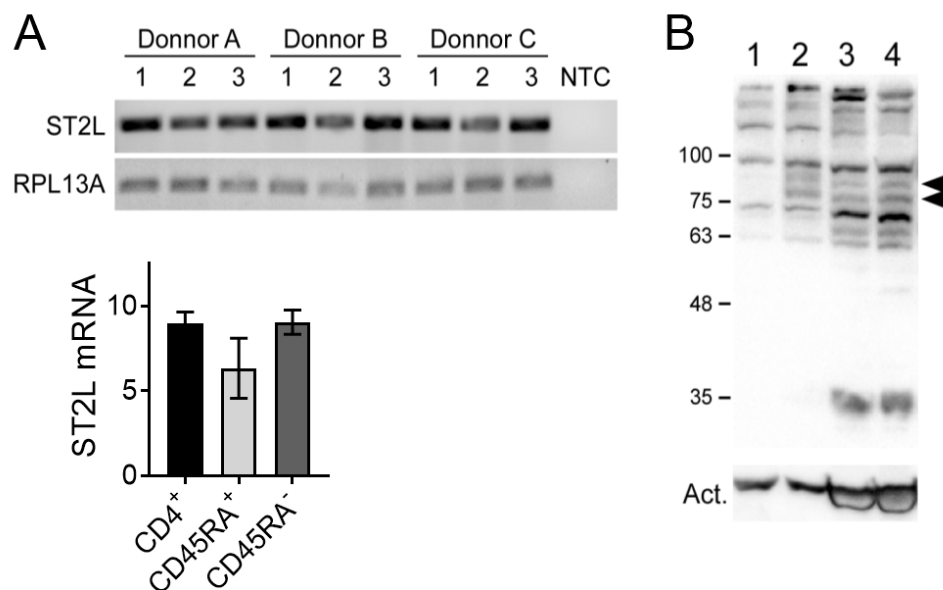


Figure 10. ST2L expression in naïve CD4⁺ T lymphocytes. (A) ST2L mRNA expression was studied by PCR in CD4⁺ (1), CD4⁺CD45RA⁺ (2) and CD4⁺CD45RA⁻ (3) cells purified by negative selection. Bands were quantified by densitometry and normalized with RPL13A expression; results from three independent donors is shown in the graph. Data are presented as mean±SEM. (B) Proteins from HEK-293 transfected with empty (1) or ST2L-encoding vectors (2), enriched CD4⁺ lymphocytes (3) and sorted CD4⁺CD45RA⁺ cells (4) were separated by SDS-PAGE. ST2L (arrows) and actin (Act.) were revealed by western blot. Molecular weights in kDa are shown on the left.

Discussion

In this study, we report that IL-33 upregulates CysLT1 expression in a ST2-dependent manner, at the protein but not at the mRNA level, in human peripheral blood lymphocytes. The increased protein expression was correlated with a higher responsiveness to LTD₄ in terms of calcium mobilisation and migration of CD4⁺ T cells. These cells were targeted independently of antigen-presenting cells and memory as well as naïve CD4⁺ T cells displayed an increase in CysLT1 expression in response to IL-33.

Because the Cayman anti-CysLT1 antibody recognizes an intracellular epitope, cells were permeabilized and the observed protein levels represented total expression. Enhanced cell surface expression of CysLT1 was further confirmed in non-permeabilized cells using an antibody recognizing an extracellular epitope. We were not able, however, to detect any modulation of CysLT1 transcript levels after IL-33 treatment (Fig. 1, B and 5, B). This suggests that IL-33 increases CysLT1 expression at a post-transcriptional level, either upregulating its translation or downregulating its degradation. In previous studies, regulation of CysLT1 expression usually occurred at the mRNA level, specifically after stimulation with cytokines such as IFN γ , IL-4, IL-5 and IL-13, in myeloid and lymphoid cells (35, 44, 45). Internalization of CysLT1 has also been shown (61-64), but whether it is then recycled or degraded remains unknown. Thus, to our knowledge, our results suggest, for the first time, a non-transcriptional regulation of CysLT1 expression in the context of enhanced total protein expression. Interestingly, IL-33 transiently activated the translation initiation factor eIF4E and the increased CysLT1 expression was dependent on the mTOR pathway, which is known to induce p70S6K and eIF4E activation (52, 54). Further studies are required to determine whether IL-33 directly targets CysLT1 translation.

Surprisingly, although CysLT1 was expressed in CD8⁺ T cells and upregulated by IL-33 to the same extent as in CD4⁺ cells, we were unable to detect any LTD₄-induced calcium mobilisation in CD8⁺ T cells either at steady state or after IL-33 stimulation (Fig. 2, B and 3, D). CysLT1 can be coupled to G α_i and G α_q proteins, and has been shown to induce calcium influx via G α_i 3 (65) and G β -cSrc-PLC γ axis in intestinal epithelial cells (66), pertussis toxin

sensitive and insensitive pathways, as well as isoprenylated proteins in the myeloid cell line U937 (67), or the $G\alpha_q$ -PLC β pathway in alveolar macrophages (68). In Th2 cells, calcium influx is also mediated by pertussis toxin sensitive and insensitive pathways (37). In contrast, CysLT1 expression and signaling has never been studied in CD8⁺ cells. Differential availability of signaling molecules could explain the observed disparities between CD4⁺ and CD8⁺ cell responses. Moreover, LTD₄-induced migration of the CD8⁺ sub-population within total lymphocytes (Fig. 4) is consistent with the work from Prinz *et al* (69) who showed a similar migration of murine CD4⁺ and CD8⁺ cells in a pool of splenic cells. Nevertheless, further experiments are needed to conclude whether CD8⁺ T cells migrate directly in response to LTD₄ and independently of calcium signaling or secondarily via CD4⁺ cell-induced signals. Finally, the functional relevance of the increased CysLT1 expression by IL-33 in CD8⁺ cells remains to be defined.

IL-33 has been shown to upregulate cytokine production in activated Th2 (12, 56), Treg (70, 71), Th1 (72, 73) and CD8⁺ T cells (74). In this regard, ST2L is expressed more by activated and memory Th2 cells (57) and Treg (71, 75) and to a lesser extent by activated Th1 cells (72) but has never been detected on naïve CD4⁺ cells (58-60). Thus, to our knowledge, naïve CD4⁺ cell responsiveness directly to IL-33 alone has never been reported. Surprisingly, IL-33 induced increased CysLT1 expression to the same extent in memory and naïve cells in a pool of purified CD4⁺ lymphocytes (Fig. 7, A). Furthermore, naïve CD4⁺ cells still responded to IL-33 when purified by negative selection or cell sorting (Fig. 9). Thus, we explored ST2L expression in naïve CD4⁺ cells. Whereas ST2L mRNA was easily revealed by PCR, we were unable to detect the protein by flow cytometry with our antibody (data not shown). Nevertheless, by western blot, comparing protein lysates from ST2L-nonexpressing versus overexpressing HEK-293 revealed 2 bands between 75 and 100kDa that are present in CD4⁺ cells, as well as in naïve cells (Fig. 10). Although the predicted molecular weight of ST2L is 63kDa, the presence of 2 bands may suggest post-translational modifications that could augment the size of the protein. Altogether, these results support that naïve T cells express ST2L and can be direct targets of IL-33.

It is well established that IL-33 can regulate the T cell cytokine profile, in the presence of TCR stimulation, driving Th2 polarisation (76), or in an antigen-independent manner if co-cultured with dendritic cells (77). Here we showed that purified CD4⁺ T cells, where professional antigen-presenting cells were efficiently depleted, still responded to IL-33. Naïve cells, which have never undergone TCR stimulation, also responded to IL-33. Moreover, although anti-CD3/CD28-driven activation of T cells induces a long-lasting increase of CysLT1 expression (unpublished observations), we only observed an early and transitory upregulation of the receptor in response to IL-33. Finally, these experiments were conducted in the absence of TCR stimulation or addition of exogenous antigen. Together, these results strongly support an antigen- and TCR-independent regulation of CysLT1 by IL-33. An innate activation of T cells by IL-33 was described by Guo *et al* (78), who showed that IL-33 induced IL-13 production by murine memory Th2 cells, independently of antigen presentation, by acting directly on T cells. However, cytokine production was reached only in the presence of a STAT5 activator, IL-7 or TSLP. In agreement, IL-33 did not induce T cell activation in our experimental conditions, as assessed by CD25 expression, and IL-4, IL-5, IL-13 and IFN γ levels in the supernatant were low or not detected (data not shown). Moreover, these effector cytokines described to be inducible by IL-33 are all dependent on TCR-transduced transcriptional programming to be expressed in T cells, reflecting the activation profile of the cells (79). Together with our results with naïve cells, this strongly suggests that the absence of cytokine production in response to IL-33 in naïve cells is more likely because their induction by IL-33 is dependent on a previously established TCR signalling rather than a deficiency in ST2L expression, as previously suggested (58-60). By contrast, CysLT1 has not been shown to induce effector functions of T cells but can regulate T cell trafficking. In this way, IL-33-induced upregulation of CysLT1 may reflect the innate targeting of T cells toward the inflammatory environment, even in the absence of antigen-specific cellular activation.

IL-33 is well known for its potent activity in initiating Th2 cytokine production during inflammation. Another capacity of the cytokine is leukocyte recruitment. Indeed, IL-33 displays direct chemotactic activity for Th2 lymphocytes (26). It is also able to promote the production of chemo-attractants such as CXCL8, CCL1, CCL2, CCL17, RANTES, MCP-1,

MIP-1a and MIP-1b by basophils (48, 80), eosinophils (48, 81) and mast cells (56, 82), and of CCL7 by endothelial cells (83). All together, these chemokines promote the infiltration of circulating granulocytes, monocyte/macrophages, lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells into damaged tissues. Here, we show that IL-33 can also increase lymphocyte recruitment to the site of inflammation by upregulating the CysLT1 receptor on peripheral T lymphocytes, promoting their migration capacity toward LTD₄. Thus, IL-33 can promote leukocyte infiltration directly as a chemotactic factor or indirectly by modulating chemotactic ligands and/or their receptor expression.

IL-33 and cysLTs are released soon after detection of allergens or virus by airway epithelial cells, and cysLT production is reinforced by resident mast cell degranulation. They both synergise to activate resident ILC2s (50) and basophils (48) which leads to IL-5 and IL-13 production. This nascent inflammation rapidly induces broncho-constriction, mucus secretion, and epithelial hyperplasia, which are characteristic features of asthma (84, 85). By inducing chemokines and their receptor counterparts, IL-33 and cysLTs also amplify leukocyte infiltration, including lymphocytes, which then leads to the full activation of the adaptive immune system. Naïve T cells usually require primary activation by dendritic cells in the lymph node to become effector cells, whereas memory cells that previously underwent this process can be directly activated at the site of inflammation. However, during asthma or lung injury, the formation of tertiary lymphoid structures allows naïve cells to be activated *in situ* (86, 87). Moreover, IL-33 has been initially described to be preferentially expressed in high endothelial venules of lymph nodes (88) and its role in memory Th2 cell recruitment to inducible bronchus-associated lymphoid tissues (iBALT) has been recently proposed (89). As suggested by our results, it would be of interest to determine whether cysLTs could cooperate with IL-33 to induce the recruitment or retention of memory as well as naïve lymphocytes in these structures.

IL-33 and cysLTs cooperate in the initiation of the cytokine and cellular immune context of asthma, reinforcing their interest as therapeutic targets. CysLT1 antagonists such as Montelukast, Pranlukast and Zafirlukast have been clinically approved and display great efficacy with few side-effects, especially to treat aspirin-exacerbated respiratory disease

(AERD) (7, 90). On the contrary, glucocorticoids or type-2 cytokine antagonists are more efficient in the context of allergic asthma (7), suggesting lipid mediators and type-2 cytokines represent complementary components of the pathogenesis of asthma with differential involvement and cross-talk depending on the endotype. As cited above, IL-33 has been well described as a potent initiator of the Th2 cytokine profile in asthma. In this respect, therapies using anti-IL-33 antibodies or recombinant sST2 are presently under trial (91). Considering that IL-33 can also act upstream of leukotrienes in the asthmatic process, enhancing FcεR-mediated cysLT production by human basophils (48) and the expression of their receptor CysLT1 on lymphocytes, our results support the potential significance of IL-33 as a therapeutic target to treat asthma.

References

1. Global Burden of Disease Study, C. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 386: 743-800.
2. Gauvreau, G. M., A. I. El-Gammal, and P. M. O'Byrne. 2015. Allergen-induced airway responses. *Eur Respir J* 46: 819-831.
3. Al-Muhsen, S., J. R. Johnson, and Q. Hamid. 2011. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128: 451-462; quiz 463-454.
4. Holgate, S. T. 2012. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 18: 673-683.
5. Heck, S., J. Nguyen, D. D. Le, R. Bals, and Q. T. Dinh. 2015. Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. *Int Arch Allergy Immunol* 168: 241-252.
6. Fajt, M. L., and S. E. Wenzel. 2015. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol* 135: 299-310; quiz 311.
7. Borish, L. 2016. The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 117: 108-114.
8. Cosmi, L., F. Liotta, and F. Annunziato. 2016. Th17 regulating lower airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 16: 1-6.
9. Robinson, D., M. Humbert, R. Buhl, A. A. Cruz, H. Inoue, S. Korom, N. A. Hanania, and P. Nair. 2017. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy* 47: 161-175.
10. Lotvall, J., C. A. Akdis, L. B. Bacharier, L. Bjerner, T. B. Casale, A. Custovic, R. F. Lemanske, Jr., A. J. Wardlaw, S. E. Wenzel, and P. A. Greenberger. 2011. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 127: 355-360.
11. Wenzel, S. E. 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18: 716-725.
12. Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479-490.
13. Moussion, C., N. Ortega, and J. P. Girard. 2008. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3: e3331.
14. Martin, N. T., and M. U. Martin. 2016. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17: 122-131.
15. Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, S. Foley, S. Audusseau, R. Olivenstein, A. J. Halayko, C. Lemiere, J. G. Martin, and Q. Hamid. 2009. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183: 5094-5103.
16. Prefontaine, D., J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, J. G. Martin, and Q. Hamid. 2010. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125: 752-754.
17. Qi, F., D. Wang, J. Liu, S. Zeng, L. Xu, H. Hu, and B. Liu. 2015. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner. *Int Immunopharmacol* 29: 408-415.

18. Tashiro, H., K. Takahashi, S. Hayashi, G. Kato, K. Kurata, S. Kimura, and N. Sueoka-Aragane. 2016. Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. *PLoS One* 11: e0157571.
19. Lefrancais, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J. P. Girard, and C. Cayrol. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1673-1678.
20. Lefrancais, E., and C. Cayrol. 2012. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23: 120-127.
21. Lefrancais, E., A. Duval, E. Mirey, S. Roga, E. Espinosa, C. Cayrol, and J. P. Girard. 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15502-15507.
22. Ali, S., M. Huber, C. Kollewe, S. C. Bischoff, W. Falk, and M. U. Martin. 2007. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18660-18665.
23. Chackerian, A. A., E. R. Oldham, E. E. Murphy, J. Schmitz, S. Pflanz, and R. A. Kastelein. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179: 2551-2555.
24. Lohning, M., A. Stroehmann, A. J. Coyle, J. L. Grogan, S. Lin, J. C. Gutierrez-Ramos, D. Levinson, A. Radbruch, and T. Kamradt. 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6930-6935.
25. Lu, J., J. Kang, C. Zhang, and X. Zhang. 2015. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunol Lett* 164: 11-17.
26. Komai-Koma, M., D. Xu, Y. Li, A. N. McKenzie, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37: 2779-2786.
27. Zhiguang, X., C. Wei, R. Steven, D. Wei, Z. Wei, M. Rong, L. Zhanguo, and Z. Lianfeng. 2010. Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett* 131: 159-165.
28. Chu, D. K., A. Llop-Guevara, T. D. Walker, K. Flader, S. Goncharova, J. E. Boudreau, C. L. Moore, T. Seunghyun In, S. Wasserman, A. J. Coyle, R. Kolbeck, A. A. Humbles, and M. Jordana. 2013. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 131: 187-200 e181-188.
29. Vocca, L., C. Di Sano, C. G. Uasuf, A. Sala, L. Riccobono, S. Gangemi, G. D. Albano, A. Bonanno, R. Gagliardo, and M. Profita. 2015. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology* 220: 954-963.
30. Zeng, S., J. Wu, J. Liu, F. Qi, and B. Liu. 2015. IL-33 Receptor (ST2) Signalling is Important for Regulation of Th2-Mediated Airway Inflammation in a Murine Model of Acute Respiratory Syncytial Virus Infection. *Scand J Immunol* 81: 494-501.
31. Haeggstrom, J. Z., and C. D. Funk. 2011. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111: 5866-5898.
32. Fanning, L. B., and J. A. Boyce. 2013. Lipid mediators and allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 111: 155-162.
33. Henderson, W. R., Jr., L. O. Tang, S. J. Chu, S. M. Tsao, G. K. Chiang, F. Jones, M. Jonas, C. Pae, H. Wang, and E. Y. Chi. 2002. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 108-116.
34. Kim, D. C., F. I. Hsu, N. A. Barrett, D. S. Friend, R. Grenningloh, I. C. Ho, A. Al-Garawi, J. M. Lora, B. K. Lam, K. F. Austen, and Y. Kanaoka. 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *J Immunol* 176: 4440-4448.

35. Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2001. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167: 2855-2860.
36. Fregonese, L., M. Silvestri, F. Sabatini, and G. A. Rossi. 2002. Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. *Clin Exp Allergy* 32: 745-750.
37. Parmentier, C. N., E. Fuerst, J. McDonald, H. Bowen, T. H. Lee, J. E. Pease, G. Woszczek, and D. J. Cousins. 2012. Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1136-1142.
38. Sarau, H. M., R. S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J. J. Foley, D. B. Schmidt, R. M. Muccitelli, O. Jenkins, P. R. Murdock, N. C. Herrity, W. Halsey, G. Sathe, A. I. Muir, P. Nuthulaganti, G. M. Dytko, P. T. Buckley, S. Wilson, D. J. Bergsma, and D. W. Hay. 1999. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56: 657-663.
39. Lynch, K. R., G. P. O'Neill, Q. Liu, D. S. Im, N. Sawyer, K. M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D. J. Figueroa, Z. Zeng, B. M. Connolly, C. Bai, C. P. Austin, A. Chateauneuf, R. Stocco, G. M. Greig, S. Kargman, S. B. Hooks, E. Hosfield, D. L. Williams, Jr., A. W. Ford-Hutchinson, C. T. Caskey, and J. F. Evans. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399: 789-793.
40. Takasaki, J., M. Kamohara, M. Matsumoto, T. Saito, T. Sugimoto, T. Ohishi, H. Ishii, T. Ota, T. Nishikawa, Y. Kawai, Y. Masuho, T. Isogai, Y. Suzuki, S. Sugano, and K. Furuichi. 2000. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 316-322.
41. Heise, C. E., B. F. O'Dowd, D. J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D. S. Im, R. Stocco, J. N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D. L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M. K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C. P. Austin, S. R. George, G. P. O'Neill, K. M. Metters, K. R. Lynch, and J. F. Evans. 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275: 30531-30536.
42. Kanaoka, Y., A. Maekawa, and K. F. Austen. 2013. Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* 288: 10967-10972.
43. Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1155-1162.
44. Early, S. B., E. Barekzi, J. Negri, K. Hise, L. Borish, and J. W. Steinke. 2007. Concordant modulation of cysteinyl leukotriene receptor expression by IL-4 and IFN-gamma on peripheral immune cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 715-720.
45. Thivierge, M., M. Doty, J. Johnson, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2000. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165: 5221-5226.
46. Thivierge, M., S. Turcotte, M. Rola-Pleszczynski, and J. Stankova. 2015. Enhanced cysteinyl-leukotriene type 1 receptor expression in T cells from house dust mite-allergic individuals following stimulation with Der p. *J Immunol Res* 2015: 384780.
47. Zhu, J., Y. S. Qiu, D. J. Figueroa, V. Bandi, H. Galczenski, K. Hamada, K. K. Guntupalli, J. F. Evans, and P. K. Jeffery. 2005. Localization and upregulation of cysteinyl leukotriene-1 receptor in asthmatic bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 531-540.

48. Pecaric-Petkovic, T., S. A. Didichenko, S. Kaempfer, N. Spiegl, and C. A. Dahinden. 2009. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113: 1526-1534.
49. Lai, Y., W. A. Altemeier, J. Vandree, A. M. Piliponsky, B. Johnson, C. L. Appel, C. W. Frevert, D. M. Hyde, S. F. Ziegler, D. E. Smith, W. R. Henderson, Jr., M. H. Gelb, and T. S. Hallstrand. 2014. Increased density of intraepithelial mast cells in patients with exercise-induced bronchoconstriction regulated through epithelially derived thymic stromal lymphopoietin and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* 133: 1448-1455.
50. von Moltke, J., C. E. O'Leary, N. A. Barrett, Y. Kanaoka, K. F. Austen, and R. M. Locksley. 2017. Leukotrienes provide an NFAT-dependent signal that synergizes with IL-33 to activate ILC2s. *J Exp Med* 214: 27-37.
51. Lund, S. J., A. Portillo, K. Cavagnero, R. E. Baum, L. H. Naji, J. H. Badrani, A. Mehta, M. Croft, D. H. Broide, and T. A. Doherty. 2017. Leukotriene C4 Potentiates IL-33-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Lung Inflammation. *J Immunol* 199: 1096-1104.
52. Salmond, R. J., A. S. Mirchandani, A. G. Besnard, C. C. Bain, N. C. Thomson, and F. Y. Liew. 2012. IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J Allergy Clin Immunol* 130: 1159-1166 e1156.
53. Han, L., M. Zhang, X. Liang, X. Jia, J. Jia, M. Zhao, and Y. Fan. 2017. Interleukin-33 promotes inflammation-induced lymphangiogenesis via ST2/TRAF6-mediated Akt/eNOS/NO signalling pathway. *Sci Rep* 7: 10602.
54. Gopfert, C., N. Andreas, F. Weber, N. Hafner, T. Yakovleva, M. Gaestel, T. Kamradt, and S. Drube. 2018. The p38-MK2/3 Module Is Critical for IL-33-Induced Signaling and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Immunol* 200: 1198-1206.
55. Mun, S. H., N. Y. Ko, H. S. Kim, J. W. Kim, D. K. Kim, A. R. Kim, S. H. Lee, Y. G. Kim, C. K. Lee, S. H. Lee, B. K. Kim, M. A. Beaven, Y. M. Kim, and W. S. Choi. 2010. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci* 67: 3883-3892.
56. Kondo, Y., T. Yoshimoto, K. Yasuda, S. Futatsugi-Yumikura, M. Morimoto, N. Hayashi, T. Hoshino, J. Fujimoto, and K. Nakanishi. 2008. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 20: 791-800.
57. Endo, Y., K. Hirahara, T. Iinuma, K. Shinoda, D. J. Tumes, H. K. Asou, N. Matsugae, K. Obata-Ninomiya, H. Yamamoto, S. Motohashi, K. Oboki, S. Nakae, H. Saito, Y. Okamoto, and T. Nakayama. 2015. The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 42: 294-308.
58. Peine, M., R. M. Marek, and M. Lohning. 2016. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol* 37: 321-333.
59. Meisel, C., K. Bonhagen, M. Lohning, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, A. Radbruch, and T. Kamradt. 2001. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol* 166: 3143-3150.
60. Guo, L., G. Wei, J. Zhu, W. Liao, W. J. Leonard, K. Zhao, and W. Paul. 2009. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13463-13468.
61. Naik, S., C. K. Billington, R. M. Pascual, D. A. Deshpande, F. P. Stefano, T. A. Kohout, D. M. Eckman, J. L. Benovic, and R. B. Penn. 2005. Regulation of cysteinyl leukotriene type 1 receptor internalization and signaling. *J Biol Chem* 280: 8722-8732.

62. Capra, V., M. R. Accomazzo, F. Gardoni, S. Barbieri, and G. E. Rovati. 2010. A role for inflammatory mediators in heterologous desensitization of CysLT1 receptor in human monocytes. *J Lipid Res* 51: 1075-1084.
63. Parhamifar, L., W. Sime, Y. Yudina, F. Vilhardt, M. Morgelin, and A. Sjolander. 2010. Ligand-induced tyrosine phosphorylation of cysteinyl leukotriene receptor 1 triggers internalization and signaling in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 5: e14439.
64. Ng, S. W., D. Bakowski, C. Nelson, R. Mehta, R. Almeyda, G. Bates, and A. B. Parekh. 2012. Cysteinyl leukotriene type I receptor desensitization sustains Ca²⁺-dependent gene expression. *Nature* 482: 111-115.
65. Nielsen, C. K., R. Massoumi, M. Sonnerlind, and A. Sjolander. 2005. Leukotriene D4 activates distinct G-proteins in intestinal epithelial cells to regulate stress fibre formation and to generate intracellular Ca²⁺ mobilisation and ERK1/2 activation. *Exp Cell Res* 302: 31-39.
66. Thodeti, C. K., J. Adolfsson, M. Juhas, and A. Sjolander. 2000. Leukotriene D(4) triggers an association between gbetagamma subunits and phospholipase C-gamma1 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 9849-9853.
67. Capra, V., M. R. Accomazzo, S. Ravasi, M. Parenti, M. Macchia, S. Nicosia, and G. E. Rovati. 2003. Involvement of prenylated proteins in calcium signaling induced by LTD4 in differentiated U937 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71: 235-251.
68. Peres, C. M., D. M. Aronoff, C. H. Serezani, N. Flamand, L. H. Faccioli, and M. Peters-Golden. 2007. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J Immunol* 179: 5454-5461.
69. Prinz, I., C. Gregoire, H. Mollenkopf, E. Aguado, Y. Wang, M. Malissen, S. H. Kaufmann, and B. Malissen. 2005. The type 1 cysteinyl leukotriene receptor triggers calcium influx and chemotaxis in mouse alpha beta- and gamma delta effector T cells. *J Immunol* 175: 713-719.
70. Schiering, C., T. Krausgruber, A. Chomka, A. Frohlich, K. Adelman, E. A. Wohlfert, J. Pott, T. Griseri, J. Bollrath, A. N. Hegazy, O. J. Harrison, B. M. Owens, M. Lohning, Y. Belkaid, P. G. Fallon, and F. Powrie. 2014. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513: 564-568.
71. Chen, C. C., T. Kobayashi, K. Iijima, F. C. Hsu, and H. Kita. 2017. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol*.
72. Baumann, C., W. V. Bonilla, A. Frohlich, C. Helmstetter, M. Peine, A. N. Hegazy, D. D. Pinschewer, and M. Lohning. 2015. T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4056-4061.
73. Komai-Koma, M., E. Wang, M. Kurowska-Stolarska, D. Li, C. McSharry, and D. Xu. 2016. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. *Immunobiology* 221: 412-417.
74. Yang, Q., G. Li, Y. Zhu, L. Liu, E. Chen, H. Turnquist, X. Zhang, O. J. Finn, X. Chen, and B. Lu. 2011. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 41: 3351-3360.
75. Siede, J., A. Frohlich, A. Datsi, A. N. Hegazy, D. V. Varga, V. Holecska, H. Saito, S. Nakae, and M. Lohning. 2016. IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGFbeta Release. *PLoS One* 11: e0161507.
76. Kurowska-Stolarska, M., P. Kewin, G. Murphy, R. C. Russo, B. Stolarski, C. C. Garcia, M. Komai-Koma, N. Pitman, Y. Li, W. Niedbala, A. N. McKenzie, M. M. Teixeira, F. Y. Liew, and D. Xu. 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181: 4780-4790.

77. Rank, M. A., T. Kobayashi, H. Kozaki, K. R. Bartemes, D. L. Squillace, and H. Kita. 2009. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123: 1047-1054.
78. Guo, L., Y. Huang, X. Chen, J. Hu-Li, J. F. Urban, Jr., and W. E. Paul. 2015. Innate immunological function of TH2 cells in vivo. *Nat Immunol* 16: 1051-1059.
79. Nakayama, T., and M. Yamashita. 2008. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. *Curr Opin Immunol* 20: 265-271.
80. Smithgall, M. D., M. R. Comeau, B. R. Yoon, D. Kaufman, R. Armitage, and D. E. Smith. 2008. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20: 1019-1030.
81. Stolarski, B., M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, D. Xu, and F. Y. Liew. 2010. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 185: 3472-3480.
82. Allakhverdi, Z., D. E. Smith, M. R. Comeau, and G. Delespesse. 2007. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 179: 2051-2054.
83. Kim, J., W. Kim, H. T. Le, U. J. Moon, V. G. Tran, H. J. Kim, S. Jung, Q. T. Nguyen, B. S. Kim, J. B. Jun, H. R. Cho, and B. Kwon. 2014. IL-33-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization depends upon CCR2. *J Immunol* 193: 3792-3802.
84. Barlow, J. L., S. Peel, J. Fox, V. Panova, C. S. Hardman, A. Camelo, C. Bucks, X. Wu, C. M. Kane, D. R. Neill, R. J. Flynn, I. Sayers, I. P. Hall, and A. N. McKenzie. 2013. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol* 132: 933-941.
85. Makrinioti, H., M. Toussaint, D. J. Jackson, R. P. Walton, and S. L. Johnston. 2014. Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir Med* 2: 226-237.
86. Elliot, J. G., C. M. Jensen, S. Mutavdzic, J. P. Lamb, N. G. Carroll, and A. L. James. 2004. Aggregations of lymphoid cells in the airways of nonsmokers, smokers, and subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 712-718.
87. Choi, G., B. S. Kim, Y. J. Park, I. Shim, and Y. Chung. 2017. Clonal Expansion of Allergen-specific CD4+ T Cell in the Lung in the Absence of Lymph Nodes. *Immune Netw* 17: 163-170.
88. Baekkevold, E. S., M. Roussigne, T. Yamanaka, F. E. Johansen, F. L. Jahnsen, F. Amalric, P. Brandtzaeg, M. Erard, G. Haraldsen, and J. P. Girard. 2003. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163: 69-79.
89. Shinoda, K., K. Hirahara, and T. Nakayama. 2017. Maintenance of pathogenic Th2 cells in allergic disorders. *Allergol Int* 66: 369-376.
90. Theron, A. J., H. C. Steel, G. R. Tintinger, C. M. Gravett, R. Anderson, and C. Feldman. 2014. Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function. *J Immunol Res* 2014: 608930.
91. Amgen. 2013. A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled, Ascending, Single Dose Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of AMG 282 in Healthy Subjects and Subjects With Mild Atopic Asthma. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01928368?term=amg+282&rank=2>.

CHAPITRE 2

RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR DE TYPE 1 DES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES PAR L'IL-33

Post-transcriptional regulation of cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression by IL-33

Marie Boudaud*, Jana Stankova*, Marek Rola-Pleszczynski*

* Service d'Immunologie et Allergologie, Département de pédiatrie, Faculté de Médecine
et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

Résumé

Le récepteur de type 1 des cystéinyl-leucotriènes (CysLT1) est un récepteur couplé aux protéines G transduisant la plupart des propriétés inflammatoires des CysLT. Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons montré que l'IL-33 augmente l'expression du récepteur des cystéinyl-leucotriènes de type 1 (CysLT1) dans les lymphocytes du sang périphérique, potentialisant ainsi leur capacité migratoire en réponse au LTD₄. Cette augmentation était détectable au niveau protéique mais pas au niveau transcriptionnel, suggérant une régulation post-transcriptionnelle. Bien que le récepteur CysLT1 possède 4 transcrits alternatifs, la régulation de son expression a été principalement décrite au niveau transcriptionnel en réponse à diverses cytokines. Dans ce deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés aux mécanismes par lesquels la cytokine régule l'expression de CysLT1 en explorant le rôle des voies de production et de dégradation protéiques. Nous montrons que l'IL-33 augmente le ratio d'expression du transcrit 1 par rapport au transcrit 4 de CysLT1. L'utilisation des inhibiteurs conventionnels de la transcription et de la traduction, l'actinomycine D et le cycloheximide, respectivement, ainsi que de siRNA dirigés contre CysLT1 ne nous permettaient pas de conclure quant à l'implication des voies de production protéiques dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33. Néanmoins, en présence des siRNA dirigés contre CysLT1, l'expression des transcrits 1 et 4 étaient moins diminués comparativement au transcrit 2, et l'IL-33 bloquait la diminution de l'expression du transcrit 1 et augmentait celle du transcrit 4. Enfin, les inhibiteurs des voies de dégradation n'affectaient pas l'augmentation d'expression du récepteur induite par l'IL-33. Ensemble, ces résultats appuient l'hypothèse d'une augmentation de la production de CysLT1 par l'IL-33, en agissant sur l'épissage alternatif ou la stabilité de ses transcrits.

Abstract

Cysteinyl-leukotriene (cysLT) receptor type 1 (CysLT1) is a G-protein-coupled receptor known to transduce inflammatory properties of cysLTs. Its expression by myeloid cells is regulated by cytokines from the inflammatory environment. Our previous work showed that interleukin (IL)-33 increases CysLT1 expression in peripheral blood lymphocytes at the protein level but not at the mRNA level, suggesting a post-transcriptional regulation. In this study, we aimed to determine whether IL-33 modulates translation or degradation of CysLT1. The expression levels of the 4 CysLT1 alternative transcripts under IL-33 stimulation were analysed by PCR. IL-33 increased the expression ratio of transcript 1 over transcript 4. Conventional transcription and translation inhibitors, actinomycin D and cycloheximide, respectively, increased CysLT1 expression so much that the involvement of the protein synthesis pathway in IL-33-induced CysLT1 upregulation was difficult to conclude. Alternatively, CysLT1 specific siRNAs did not inhibit IL-33-induced CysLT1 expression. Nevertheless, IL-33 prevented and accentuated siRNA-induced reduction of transcript 1 and transcript 4, respectively, suggesting that the siRNAs did not completely block CysLT1 translation. Moreover, proteasomal and lysosomal inhibitors did not block IL-33-induced CysLT1 expression. Altogether, these results suggest that IL-33 regulates CysLT1 alternative splicing or transcript stability, favoring transcript 1 at the expense of transcript 4, providing new insight into CysLT1 expression regulation.

Introduction

Au cours d'une réaction asthmatique, l'interleukine (IL)-33 est abondamment libérée par les cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques, musculaires et myéloïdes en réponse aux allergènes, virus ou dommages tissulaires (Jackson *et al.*, 2014 ; Makrinioti *et al.*, 2014 ; Prefontaine *et al.*, 2009 ; Prefontaine *et al.*, 2010). Suite à des clivages par les protéases éosinophiliques et neutrophiliques (Cayrol *et al.*, 2018 ; Lefrancais et Cayrol, 2012), la cytokine mature est reconnue par son récepteur ST2L exprimé par la plupart des cellules hématopoïétiques (Moritz *et al.*, 1998 ; Mun *et al.*, 2010 ; Neill *et al.*, 2010 ; Peine *et al.*, 2016 ; Rank *et al.*, 2009 ; Smithgall *et al.*, 2008). En dimérisant avec la protéine accessoire du récepteur à l'IL-1 (IL-1RAcP), ST2L active les voies de signalisation de NFκB, des MAPKs et de Akt/mTOR (Ali *et al.*, 2007 ; Chackerian *et al.*, 2007 ; Han *et al.*, 2017 ; Salmond *et al.*, 2012), induisant la transcription et la traduction de diverses cytokines. Parmi celles-ci, l'IL-5 et l'IL-13 induisent l'éosinophilie et l'hyperplasie épithéliale, respectivement (Kondo *et al.*, 2008 ; Schmitz *et al.*, 2005 ; Zhiguang *et al.*, 2010). Ainsi, l'IL-33 initie le profil inflammatoire et symptomatique caractéristique de l'asthme et constitue une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'asthme.

Les leucotriènes (LT)-D₄, C₄ et E₄ composent la famille des cystéinyl-leucotriènes (cysLTs), issus du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la 5-lipoxygénase et de la LTC₄-synthase (Haeggstrom et Funk, 2011). Initialement caractérisés pour leur fort potentiel broncho-constricteur (Dahlen *et al.*, 1980 ; Sirois et Borgeat, 1980), les cysLTs participent aussi au développement de l'inflammation associée à l'asthme et aux allergies en induisant l'infiltration leucocytaire et la production de cytokines (Fregonese *et al.*, 2002 ; Ichiyama *et al.*, 2007 ; Parmentier *et al.*, 2012 ; Rola-Pleszczynski et Stankova, 2007 ; Shirasaki *et al.*, 2017 ; Shirasaki *et al.*, 2002 ; Woszczek *et al.*, 2008). Trois récepteurs couplés aux protéines G ont été caractérisés et reconnaissent les cysLTs avec des affinités différentes. CysLT1 et CysLT2 reconnaissent en ordre d'affinité le LTD₄>LTC₄>LTE₄ et le LTD₄=LTC₄>>LTE₄, respectivement (Heise *et al.*, 2000 ; Lynch *et al.*, 1999 ; Sarau *et al.*, 1999 ; Takasaki *et al.*, 2000), alors que le récepteur CysLT3/GPR99 reconnaît préférentiellement le LTE₄ et faiblement le LTC₄ et le LTD₄ (Kanaoka *et al.*, 2013).

Le récepteur CysLT1 est fortement exprimé par les cellules hématopoïétiques et transduit la plupart des propriétés inflammatoires des cysLTs (Figuroa *et al.*, 2001 ; Lynch *et al.*, 1999 ; Rola-Pleszczynski et Stankova, 2007). Le gène humain *CYSLT1* est composé de 5 exons, et quatre transcrits issus de l'épissage alternatif des exons 2 à 4 ont été caractérisés (Woszczek *et al.*, 2005). La régulation de l'expression de CysLT1 a été principalement décrite au niveau transcriptionnel, positivement en réponse à l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et le TGF β dans les cellules myéloïdes (Shirasaki *et al.*, 2002 ; Thivierge *et al.*, 2001), les éosinophiles (Thivierge *et al.*, 2000) et les lymphocytes (Early *et al.*, 2007 ; Thivierge *et al.*, 2015), et négativement en réponse au LPS, au zymosan, à l'IL-10 ou au PGE2 dans les cellules myéloïdes (Thivierge *et al.*, 2006 ; Thivierge *et al.*, 2009). Au contraire, la régulation de l'épissage alternatif et son influence sur l'expression protéique du récepteur CysLT1 ont été rarement étudiées (Sokolowska *et al.*, 2009 ; Woszczek *et al.*, 2005). De même, bien que plusieurs études aient décrit une désensibilisation et/ou une internalisation du récepteur, les mécanismes par lesquels il est recyclé ou dégradé n'ont jamais été explorés (Capra *et al.*, 2010 ; Naik *et al.*, 2005 ; Parhamifar *et al.*, 2010). Dans le chapitre 1, nous avons montré que l'IL-33 augmente l'expression de CysLT1 au niveau protéique mais pas au niveau transcriptionnel, suggérant (1) une augmentation de la production protéique ou (2) une diminution de la dégradation de CysLT1. Dans ce deuxième chapitre, plusieurs approches expérimentales visant à explorer ces hypothèses sont présentées et discutées.

Matériels et Méthodes

Produits

L'IL-33 recombinant humain provenait de Peprotech (Rocky Hill, New Jersey). Les anticorps suivants ont été utilisés pour la cytométrie en flux : l'anticorps de lapin dirigé contre la queue C-terminale du récepteur CysLT1 humain (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan), l'anticorps isotypique IgG de lapin (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama), l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les IgG de lapins et couplé à AF488 (Invitrogen, Life Technologies, Eugene, Oregon), l'anticorps de souris anti-CD3 humain (BD Pharmingen, San Diego, California). L'actinomycine D provenait de Enzo Life Sciences Inc (Farmingdale, New York). Le cycloheximide, l'aprotinine, et la leupeptine provenaient de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri), l'inhibiteur du protéasome provenait de Calbiochem (Proteasome inhibitor I, EMD Millipore Corp, Billerica, Massachusetts). La bafilomycine A1 provenait de Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan). Les petits ARN interférant (siRNA) témoins et dirigés contre CysLT1 étaient fournis avec le kit TriFECTa DsiRNA Kit conçu par Integrated DNA Technologies (Skokie, Illinois). Les siRNA dirigés contre CysLT1 consistaient en un mélange équimolaire des DsiRNA hs.Ri.CYSLTR1.13.1 et hs.Ri.CYSLTR1.13.2.

Isolement et stimulation des lymphocytes du sang périphérique humain

Les cellules du sang périphérique humain ont été obtenues à partir de donneur en santé après consentement éclairé, dans le respect des directives de la déclaration de Helsinki de l'association médicale internationale (World Medical Association) et avec approbation du comité d'éthique institutionnel. Les lymphocytes du sang périphériques ont été purifiés en suivant le protocole précédemment décrit (voir chapitre 1, *Materials and Methods*). Brièvement, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été isolées par sédimentation sur dextran puis par centrifugation sur gradient de Ficoll-Paque® (GE Healthcare Life Sciences, Canada). Les monocytes ont été séparés des lymphocytes par adhérence sur pétris préalablement traités avec du sérum autologue défibriné. Les lymphocytes non-adhérents ont ensuite été incubés dans du milieu de culture (RPMI 1640, 5% SVF décomplémenté, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine) dans des pétris non

traités pour la culture de tissu (NTC) pendant une nuit avant d'être stimulés. Le jour suivant, les cellules ont été resuspendues dans du milieu frais à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml en plaque NTC et stimulées avec 5ng/ml d'IL-33 pendant 9h. Quand mentionnés, les inhibiteurs pharmacologiques ont été ajoutés au milieu 15min avant la stimulation avec l'IL-33, aux concentrations suivantes : 10 μ M d'actinomycine D, 350nM de cycloheximide, 50 μ M d'inhibiteur du protéasome, 2 μ g/ml d'aprotinine, 50 μ M de leupeptine, 100nM de bafilomycine A1.

Extraction d'ARN, Transcription inverse (RT) et Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Huit millions de cellules ont été lysées dans 1ml de TRIzol®Reagent (LifeTechnologies, Burlington, Ontario) et congelées à -80°C. Après décongélation, les ARN ont été extraits par ajout de chloroforme en suivant le protocole fournis par LifeTechnologies. Un microgramme d'ARN a été utilisé pour la transcription inverse, en présence de 20UI de RNase OUT (Invitrogen, ThermoFisher), avec le kit et selon le protocole fourni de QIAGEN (QuantiTect® Reverse Transcription Kit, QIAGEN, Toronto, Ontario). L'expression transcriptionnelle de CysLT1 et de ses transcrits alternatifs a été mesurée par PCR quantitative ou par PCR simple. Pour la PCR quantitative, les ADNc ont été amplifiés avec la Taq polymérase fournie par Feldan Bio (Québec, Québec), selon le protocole précédemment décrit (voir chapitre 1, *Materials and Methods*). Les transcrits alternatifs de CysLT1 ont été analysés par PCR simple avec le kit de QIAGEN (*Taq* PCR Master Mix Kit, QIAGEN, Toronto, Ontario). Après 5min de dénaturation, et 30 (GAPDH, CysLT1) ou 40 cycles (transcrits alternatifs) d'amplification (30sec à 95°C, 30sec à 58°C, 30sec à 72°C), les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 1.

Analyse in silico des exons 2 et 3 de CYSLT1

Les séquences exoniques 2 et 3 flanquées de 25pb des introns respectifs en 3' et 5' ont été analysées pour la présence de sites de liaison de protéines (RBPs, *RNA-binding proteins*) à l'aide de la plateforme d'analyse RBPDB (*The database for rna-binding protein specificities*, <http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/>) (Cook *et al.*, 2011).

| ARNm | Amorce sens (5'→3') | Amorce anti-sens (5'→3') |
|--|------------------------|---------------------------|
| <i>GAPDH</i> | TCAACGGATTTGGTCGTATTGG | GATGGGATTTCCATTGATGACA |
| <i>CYSLT1</i> | CCTCAGCACCTATGCTTTGT | ATTGTCTTGTGGGGGCTCAA |
| <i>CYSLT1, transcrit 1</i> (NM_001282187.1) | TGAGAACAAACGCAAAAGA | GGCCAAGAGAGCGCTTATATC |
| <i>CYSLT1, transcrit 2</i> (NM_001282186.1) | TTGAAGTTAGCAGGCACAAAG | TTGTGAACATAATAGACCACACG |
| <i>CYSLT1, transcrit 3</i> (NM_006639.3) | AAGTTAGCAGCGTGGGCT | TTGTGAACATAATAGACCACACG |
| <i>CysLT1, transcrit 4</i> (NM_001282188.1) | TGAGAACAAACGCAAAAGGA | AGTCTATCATTTTCAGCTGCTTATT |

Tableau 1. Séquences des amorces utilisées pour amplifier les transcrits de GAPDH et CysLT1.

Mesure de l'expression de CysLT1 par cytométrie en flux

Les cellules ont été lavées avec du PBS, fixées 15min avec du PBS contenant 2% de paraformaldéhyde, et perméabilisées pendant 15min avec du PBS contenant 0,1% de saponine, avant d'être incubées pendant 15min à température ambiante dans du PBS contenant 2% de BSA (PBS-2% BSA), 1mg/ml d'IgG humaines et un anticorps anti-CD3 conjugué à APC. Après un lavage au PBS, les cellules ont été incubées pendant 45min dans du PBS-2% BSA contenant 30µg/ml d'IgG humaines et les concentrations optimales d'anticorps rabiques anti-CysLT1 humain. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois et l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG rabique conjugué à AF488 a été ajouté. Après 3 lavages, l'expression de CysLT1 a été mesurée à l'aide d'un cytomètre en flux CytoFLEX et analysée avec le logiciel CytExpert (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario).

Nucléofection des lymphocytes du sang périphérique

Les lymphocytes ont été lavés au PBS et resuspendus dans du tampon de nucléofection (25mM HEPES ; 120mM KCl ; 2mM MgCl₂•6 H₂O ; 10mM K₂HPO₄ ; 5nM L-Cystéine ; pH 7,60) à raison de 8.10⁶ cellules/100µl. Les siRNA ont été ajoutés aux concentrations citées ou à 300nM, puis les cellules ont été électroporées avec un Nucleofector I (Amaxa Biosystems, Cologne, Allemagne) suivant le programme U14. Immédiatement après nucléofection, les cellules ont été transférées dans du RPMI 1640 contenant 10% de SVF décomplémenté (RPMI-10% SVF), centrifugées, puis incubées dans du RPMI-10% SVF à

raison de 4.10^6 cellules/ml, en plaques NTC. Une heure après la nucléofection, les cellules ont été stimulées avec 5ng/ml d'IL-33 pendant 9h.

Analyses statistiques

Les graphes et analyses statistiques ont été faits à l'aide du programme GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Des ANOVA à une ou deux voies ont été appliquées aux comparaisons par une ou deux variables, respectivement, et ont été suivies du test de comparaisons multiples de Sidak.

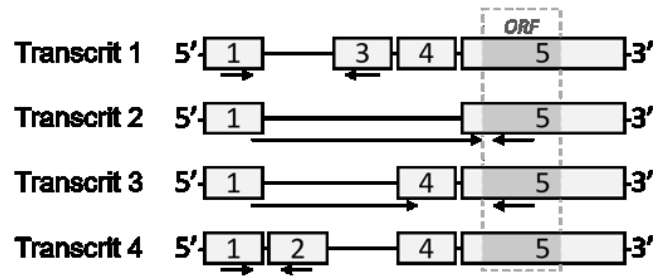
Résultats

Analyse des profils d'expression des transcrits alternatifs de CysLT1 en réponse à l'IL-33

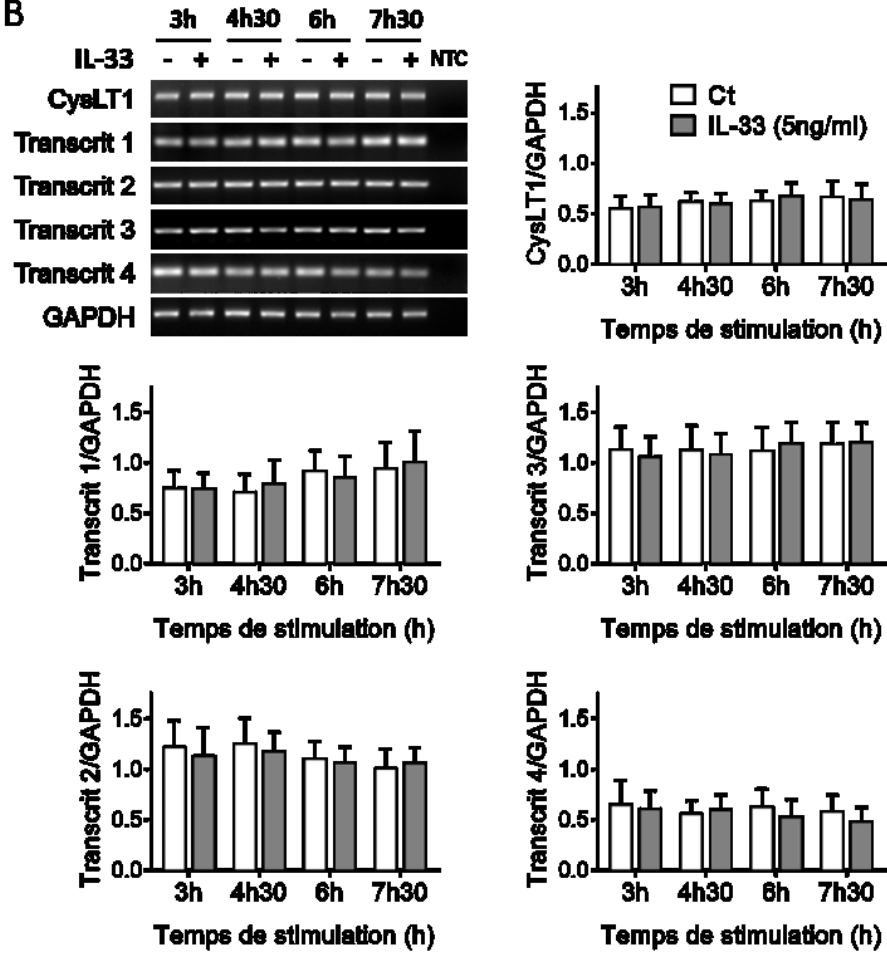
Le gène CYSLT1 est composé de 5 exons. Quatre transcrits issus de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 4 ont été décrits (Woszczek *et al.*, 2005). Pour vérifier si l'IL-33 peut affecter l'épissage alternatif de CysLT1, des lymphocytes du sang périphérique humain ont été stimulés avec 5ng/ml d'IL-33 et le niveau d'expression de chaque transcrit a été déterminé par PCR simple avec des amorces spécifiques (Tableau 1 et Figure 1, A). Dans le premier chapitre, nous avons montré que l'IL-33 n'affecte pas le niveau d'ARNm total de CysLT1 en utilisant des amorces de PCR spécifiques de l'exon 5 commun aux quatre transcrits. Ce résultat a été confirmé et est présenté dans la figure 1, B. Comme il a été précédemment décrit (Woszczek *et al.*, 2005), les transcrits 2 et 3 étaient facilement détectés par PCR simple avec les amorces chevauchant les jonctions exoniques 1-5 et 1-4, respectivement (Figure 1, A et B). Néanmoins, leur expression n'était pas modulée par l'IL-33 (Figure 1, B). En utilisant des amorces au sein des exons 3 et 2, nous avons pu amplifier les transcrits 1 et 4, respectivement. L'IL-33 ne modifiait pas non plus de façon significative le niveau d'expression de ces derniers (Figure 1, B). En revanche, la figure 1, C montre que le ratio d'expression du transcrit 1 sur le transcrit 4 était significativement augmenté par l'IL-33 au cours du temps, après 6h et 7h30 de stimulation. Ces résultats suggèrent donc que l'IL-33 régulerait l'épissage alternatif ou la stabilité des transcrits alternatifs de CysLT1, délaissant le transcrit 4 au profit du transcrit 1.

▼ **Figure 1. Modulation des niveaux de transcrits alternatifs de CysLT1 par l'IL-33 dans les lymphocytes du sang périphérique humain.** (A) Représentation schématiques des 4 transcrits alternatifs de CysLT1. Les exons 1 à 5 sont représentés par les boîtes gris clair. Le cadre de lecture ouvert (ORF) est indiqué en gris foncé. Les positions des séquences complémentaires des amorces conçues pour amplifier chaque transcrit sont indiquées par des flèches. (B et C) Des lymphocytes du sang périphérique humain ont été stimulés avec 5ng/ml d'IL-33. Les transcrits de CysLT1 ont été amplifiés par PCR simple et analysés sur gels d'agarose 2%. (B) Une expérience représentative est montrée, ainsi que la compilation de l'intensité des bandes pour chaque transcrit normalisées sur le GAPDH. Les moyennes \pm SEM sont présentées, n=5-7 (C) Ratio de l'intensité des bandes du transcrit 1 par rapport au transcrit 4. Les moyennes \pm SEM sont présentées. *p<0.05, ANOVA à deux voies, comparaison multiple de Sidak, n=6-7.

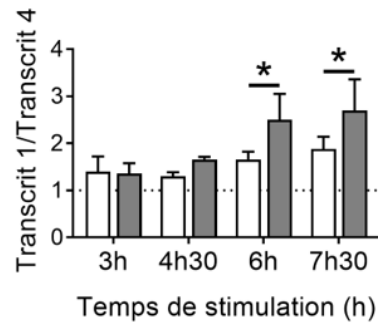
A



B



C



Analyse in silico des exons 2 et 3 de CYSLT1

L'épissage alternatif et la stabilité des ARNm sont des processus régulés par des facteurs cis-régulateurs (séquence, structure et modifications chimiques de l'ARNm) et *trans*-régulateurs (complexes enzymatiques, ARN non-codants ou protéines liant l'ARN –RBPs, *RNA-binding proteins*) (Dvinge, 2018). Les séquences des exons 2 et 3 de CYSLT1, encadrées des introns 1/2 et 2/3, respectivement, ont été analysées *in silico* dans le but de déterminer le profil des RBPs pouvant réguler l'expression relative des transcrits 1 et 4 (Tableau 2 et 3, respectivement). Les RBPs identifiées étaient des facteurs d'épissage (SFRS1, SFRS9, SFRS13A, ZRANB2, FUS), des régulateurs de l'épissage alternatif (KHDRBS3, MBNL1), des protéines de stabilisation de l'ARNm (ELAVL1, Pum2) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4B. De façon intéressante, ces facteurs n'étaient pas les mêmes pour les deux exons. Ensemble, ces résultats complètent l'hypothèse d'une régulation de l'épissage alternatif ou de la stabilité des transcrits de CysLT1 par l'IL-33 et proposent des cibles potentielles de cette régulation.

| Score | Relative Score | RBP Name | Start | End | Matching sequence | Matrix ID |
|-------------|----------------|-------------------------|-------|-----|-------------------|-------------------------------|
| 10.3039431 | 100% | ZRANB2 | 84 | 89 | AGGUAA | 1285_19304800 |
| 7.3693752 | 100% | FUS | 105 | 108 | GGUG | 637_11098054 |
| 7.08652094 | 100% | SFRS9 | 24 | 28 | AGGAC | 797_17548433 |
| 5.256645851 | 81% | EIF4B | 25 | 28 | GGAC | 352_8846295 |
| 5.08752947 | 99% | SFRS13A | 22 | 28 | AAAGGAC | 1169_19561594 |
| 4.62028767 | 100% | SFRS1 | 24 | 27 | AGGA | 1173_19561594 |
| 4.4205509 | 95% | KHDRBS3 | 49 | 54 | UCUAAU | 1174_19561594 |
| 4.40359056 | 100% | ELAVL1 | 8 | 11 | GUUU | 1170_19561594 |
| 4.40359056 | 100% | ELAVL1 | 80 | 83 | GUUU | 1170_19561594 |
| 4.1881759 | 90% | SFRS1 | 107 | 110 | UGGA | 1173_19561594 |
| 4.142143128 | 89% | KHDRBS3 | 74 | 79 | ACUAAA | 1174_19561594 |
| 4.11479981 | 80% | SFRS13A | 30 | 36 | AGAGAUC | 1169_19561594 |
| 4.044295083 | 86% | KHDRBS3 | 19 | 24 | UUUAAA | 1174_19561594 |
| 3.82636396 | 86% | ELAVL1 | 93 | 96 | AUUU | 1170_19561594 |
| 3.82636396 | 86% | ELAVL1 | 15 | 18 | AUUU | 1170_19561594 |

Séquence analysée :

1 AAAUAUGUU UGAAAUUUUU UAAAGGACAA GAGAUCCAAG UAGAGCAAUC UAAUAAGCAG 71
 CUGAAAAUGA UAGACUAAAG UUUAGGUAAG UCAUUUGUGG CUGUGGUGGA

▲ Tableau 2. Analyse in silico des sites de liaison de RBPs au sein de l'exon 2 de CYSLT1. La séquence de l'exon 2 de CYSLT1 flanquée de 25pb en 5' et 3' correspondant

aux séquences introniques 1 et 2, respectivement (en gris), a été analysée avec la base de données RBPDB (<http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/>).

| Score | Relative Score | RBP Name | Start | End | Matching sequence | Matrix ID |
|-------------|----------------|------------------------|-------|-----|-------------------|-------------------------------|
| 7.3693752 | 100% | FUS | 112 | 115 | GGUG | 637 11098054 |
| 7.2294196 | 100% | Pum2 | 120 | 123 | UGUA | 329 11780640 |
| 6.4668404 | 100% | EIF4B | 31 | 34 | GGAA | 352 8846295 |
| 6.17832025 | 93% | MBNL1 | 94 | 97 | CGCU | 669 20071745 |
| 5.256645851 | 81% | EIF4B | 47 | 50 | GGAC | 352 8846295 |
| 4.62028767 | 100% | SFRS1 | 30 | 33 | AGGA | 1173 19561594 |
| 4.62028767 | 100% | SFRS1 | 81 | 84 | AGGA | 1173 19561594 |
| 4.1881759 | 90% | SFRS1 | 46 | 49 | UGGA | 1173 19561594 |
| 3.82636396 | 86% | ELAVL1 | 42 | 45 | AUUU | 1170 19561594 |

Séquence analysée :

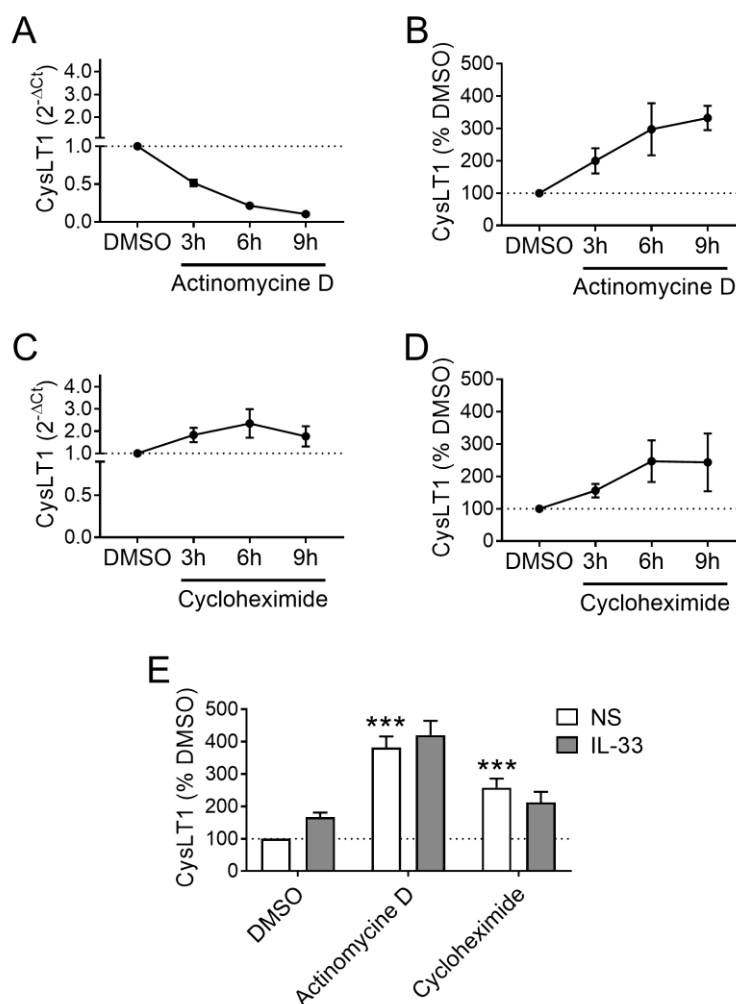
1 CACUUUUCUC UUUUGUCUCU UCAAGCAGAA GGAAGGCAUC UAUUUUGGAC UUGCAAGCUG
71 UGCAGCCUGG GAUAAGAAGA AGGAUGAUU AAGCGCUCUC UUGGCCUGGU UGGUGUCUCU
131 GUAGGUCACA UGC

▲ Tableau 3. Analyse in silico des sites de liaison de RBPs au sein de l'exon 3 de CYSLT1. La séquence de l'exon 3 de CYSLT1 flanquée de 25pb en 5' et 3' correspondant aux séquences introniques 2 et 3, respectivement (en gris), a été analysée avec la base de données RBPDB (<http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/>).

33 *Implication des voies de production protéiques dans la régulation de CysLT1 par l'IL-*

Nous avons montré dans le premier chapitre que les voies calciques et mTOR pourraient être partiellement impliquées dans l'augmentation d'expression de CysLT1 induite par l'IL-33. L'activation de la voie Akt/mTOR par l'IL-33 a déjà été décrite comme régulant positivement la transcription et la traduction de cytokines (Gopfert *et al.*, 2018 ; Salmond *et al.*, 2012). Nous avons donc exploré l'implication des voies transcriptionnelles et traductionnelles en présence d'actinomycine D et de cycloheximide, respectivement. En présence d'actinomycine D, le niveau d'ARNm diminuait drastiquement au cours du temps avec une demi-vie d'environ 3h (Figure 2, A), confirmant des résultats précédemment décrits dans les monocytes humains (Thivierge *et al.*, 2001). Dans le même temps, l'expression protéique de CysLT1 était fortement augmentée, jusqu'à 330% à 9h (Figure 2, B). En présence de cycloheximide, le niveau d'ARNm codant CysLT1 augmentait au cours du temps (Figure 2, C), reflétant l'action stabilisatrice de l'inhibiteur sur l'ARNm (Hershko *et*

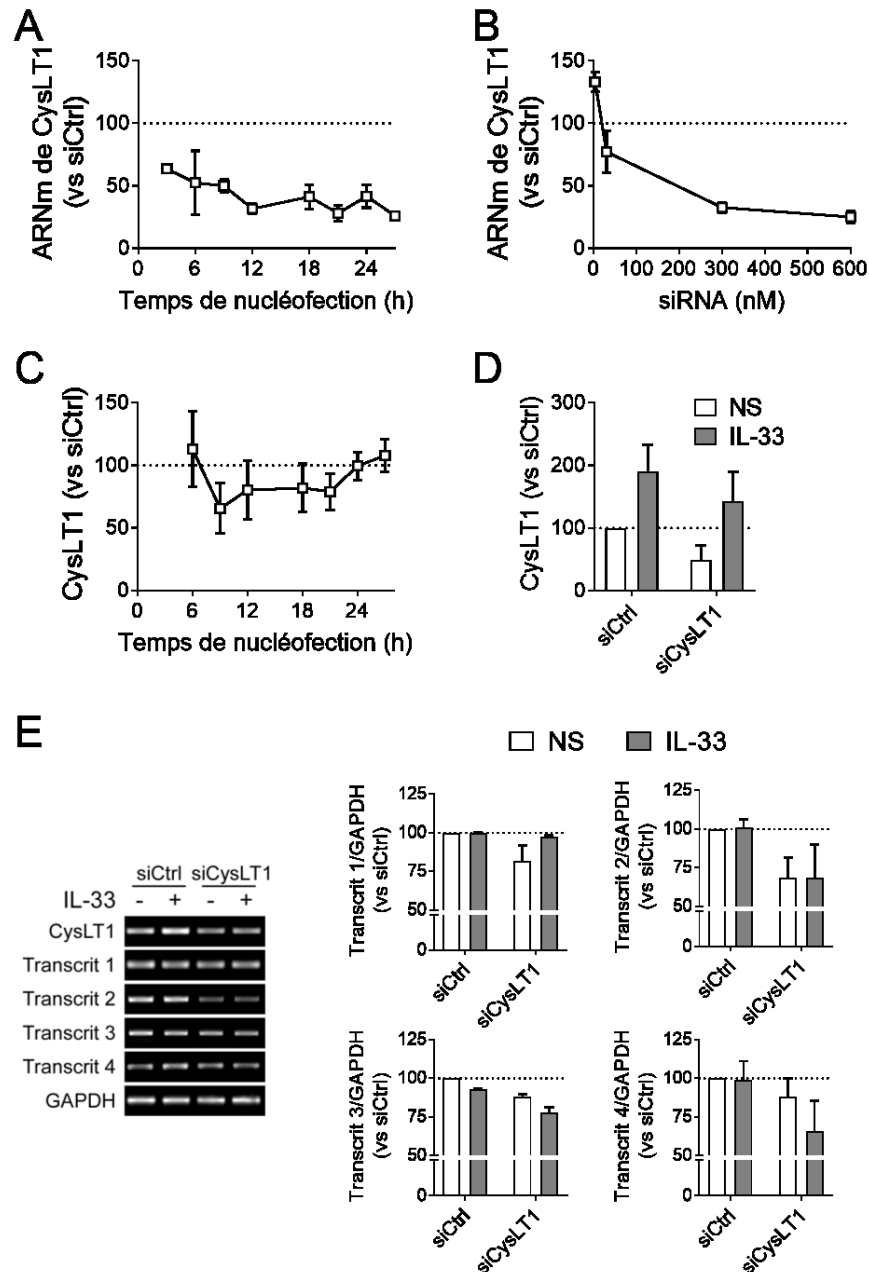
al., 2004 ; Ohh et Takei, 1995). De plus, l'expression protéique de CysLT1 était aussi augmentée en présence de cycloheximide, jusqu'à 250% à 6h (Figure 2, D). Finalement, en présence des inhibiteurs, l'augmentation de l'expression protéique de CysLT1 induite après 9h de stimulation avec l'IL-33 n'était pas détectée (Figure 2, E). Néanmoins, l'augmentation induite par les inhibiteurs était tellement forte qu'il est difficile de conclure s'ils bloquaient réellement l'action de l'IL-33 ou bien si l'expression du récepteur ou sa détection étaient saturées.



▲ Figure 2. Modulation de l'expression de CysLT1 par l'actinomycine D et le cycloheximide. (A-D) Les lymphocytes du sang périphérique ont été incubés avec 10μM d'actinomycine D (A et B) ou 100μg/ml de cycloheximide (C et D) pour les temps indiqués. L'expression de CysLT1 a été analysé au niveau de l'ARNm par qPCR (A et C) ou au niveau protéique par cytométrie en flux (C et D), n=3. (E) Les lymphocytes du sang périphérique ont été incubés 15min avec 10μM d'actinomycine D ou 100μg/ml de cycloheximide puis stimulés pendant 9h avec 5ng/ml d'IL-33. L'expression de CysLT1 a été analysé par

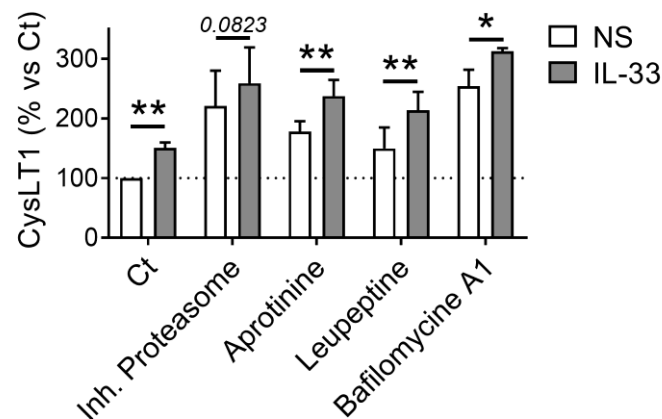
cytométrie en flux. Les moyennes \pm SEM sont présentées *** $p < 0.001$ versus DMSO, ANOVA à deux voies, comparaison multiple de Sidak, $n=8$.

L'actinomycine D et le cycloheximide sont des inhibiteurs de synthèse non spécifiques de la voie de production de CysLT1, et l'augmentation induite de l'expression du récepteur peut être indirecte via l'abolition de la production d'un régulateur négatif de CysLT1. Comme alternative, nous avons donc utilisé des siRNA pour réduire spécifiquement les niveaux d'ARNm codant CysLT1 et ainsi sa synthèse protéique. Les siRNA diminuaient les niveaux d'ARNm codant CysLT1 en fonction de la concentration et au cours du temps, jusqu'à 70% après 18h de nucléofection avec 300nM de siRNA (Figure 3, A et B). Bien que la diminution du niveau d'ARNm fût maintenue jusqu'à 27h, l'expression protéique du récepteur diminuait sensiblement jusqu'à 9h puis remontait après 21h (Figure 3, C), suggérant un effet des siRNA restreinte aux 12 premières heures. Nous avons donc stimulé les lymphocytes du sang périphérique avec 5ng/ml d'IL-33 pendant 9h, après 1h de nucléofection avec 300nM de siRNA. Dix heures après la nucléofection, le niveau protéique de CysLT1 était diminué de 50% par le siRNA spécifique (Figure 3, D). Néanmoins, l'expression du récepteur CysLT1 était augmentée par l'IL-33 dans les cellules nucléofectées avec le siRNA témoin comme avec le siRNA spécifique de CysLT1 (Figure 3, D), suggérant que l'IL-33 n'affecterait pas les voies de synthèse de CysLT1. Néanmoins, considérant que l'IL-33 affecterait les niveaux de transcrits 1 et 4 de CysLT1 mais pas les transcrits majoritaires 2 et 3 (Figure 1), nous avons vérifié si les siRNA dirigés contre CysLT1 affectaient tous les transcrits alternatifs de la même façon. Analysé par PCR simple, le niveau d'ARNm total de CysLT1 n'était diminué que d'environ 20% par les siRNA spécifiques après 10h de nucléofection (Figure 3, E, conditions NS). Le transcrit 2 était plus fortement affecté avec une baisse de 30% alors que les transcrits 1, 3 et 4 n'étaient diminués que de 10% (Figure 3, E, conditions NS). De plus, l'IL-33 rétablissait le niveau d'expression du transcrit 1 et tendait à renforcer la perte des transcrits 3 et 4, alors que le transcrit 2 n'était pas affecté (Figure 3, E). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une stabilisation du transcrit 1 par l'IL-33.



▲ Figure 3. Régulation de l'expression de CysLT1 par ARN interférant. (A-C) Les lymphocytes du sang périphérique humain ont été nucléofectés avec les concentrations indiquées ou 300nM (A et C) de siRNA contrôle ou dirigé contre CysLT1, l'ARNm ou la protéine étaient analysés après les temps indiqués ou 18h (B). L'expression de CysLT1 a été analysée au niveau de l'ARNm par qPCR (A et B) ou au niveau protéique par cytométrie en flux (C), n=2-5. (D et E) Les lymphocytes du sang périphérique ont été stimulés avec 5ng/ml d'IL-33 pendant 9h, une heure après la nucléofection avec 300nM de siRNA témoin (siCtrl) ou dirigé contre CysLT1 (siCysLT1). (D) L'expression de CysLT1 a été mesurée par cytométrie en flux, n=4. (E) L'expression des transcrits alternatifs de CysLT1 a été analysé par PCR simple, sur gel d'agarose 2%. Une expérience représentative est présentée à gauche et la quantification de chaque transcrit normalisée sur le GAPDH est présentée à droite, n=2-3. Les moyennes \pm SEM sont présentées.

Pour déterminer si l'IL-33 augmente l'expression de CysLT1 en régulant les voies de dégradation protéiques, les lymphocytes du sang périphériques ont été stimulés avec 5ng/ml d'IL-33 en présence d'inhibiteur du protéasome ou d'inhibiteurs de la voie lysosomale (aprotinine, leupeptine et bafilomycine A1). En absence d'inhibiteurs, l'IL-33 augmentait l'expression de CysLT1 de 62% (Figure 4). Bien que tous les inhibiteurs augmentassent l'expression de CysLT1 par eux-mêmes, ils ne bloquaient pas l'augmentation induite par l'IL-33 (Figure 4). De plus, les actions de l'IL-33 et des inhibiteurs semblaient additives (Figure 4). Ces résultats suggèrent que les voies de dégradation protéolytique ne sont pas impliquées dans la régulation de CysLT1 par l'IL-33.



▲ **Figure 4. Modulation par les inhibiteurs des voies de dégradation protéasomales et lysosomales de l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33.** Les lymphocytes du sang périphérique ont été incubés 15min avec les inhibiteurs du protéasome, des protéases lysosomales (aprotinine et leupeptine) ou des pompes à protons V-ATPases (Bafilomycine A1), puis stimulés avec 5ng/ml d'IL-33 pendant 9h. L'expression de CysLT1 a été mesurée par cytométrie en flux. Les moyennes \pm SEM sont présentées. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA à deux voie, comparaison multiple de Sidak, $n = 3-6$.

Discussion

Dans ce chapitre, nous avons exploré les mécanismes par lesquels l'IL-33 peut réguler l'expression de CysLT1. Nos résultats tendent à montrer pour la première fois une modulation des niveaux des transcrits alternatifs de CysLT1 en réponse à une cytokine. En effet, ils suggèrent que l'IL-33 pourrait augmenter l'expression protéique de CysLT1 à partir du transcrit 1. Nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales pour déterminer le rôle des voies de production ou de dégradation protéique dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33 et avons obtenu des résultats appuyant cette hypothèse.

À ce jour, la régulation de l'expression de CysLT1 par diverses cytokines a surtout été décrite au niveau transcriptionnel (Early *et al.*, 2007 ; Shirasaki *et al.*, 2002 ; Thivierge *et al.*, 2000 ; Thivierge *et al.*, 2001 ; Thivierge *et al.*, 2006 ; Thivierge *et al.*, 2009 ; Thivierge *et al.*, 2015), mais très peu au niveau post-transcriptionnel. Pourtant, la présence de quatre transcrits alternatifs qui se différencient uniquement par leur région 5'UTR suggère fortement que la composition nucléique de cette région puisse jouer un rôle dans la régulation de l'expression traductionnelle du récepteur. Selon l'étude de Woszczek *et al.*, le transcrit 2 (composé des exon 1 et 5) est le plus fortement exprimé, suivi du transcrit 3 (composé des exon 1, 4 et 5) puis des transcrits 1 et 4 (composés des exons 1, 3 ou 2, 4 et 5) (Woszczek *et al.*, 2005). Il semblerait donc que plus la région 5'UTR est longue, moins le transcrit est abondant, et donc que les exons 2, 3 et 4 affectent l'expression ou la stabilité de l'ARNm de CysLT1. En 2009, Sokolowska *et al.* ont publié que le niveau d'expression du transcrit 2 était plus faible dans les PBMC de femmes asthmatiques homozygotes pour un haplotype majeur dans le promoteur de CysLT1 comparativement aux femmes non asthmatiques du même haplotype (Sokolowska *et al.*, 2009). Cette étude suggérait ainsi une régulation génétique de l'expression des transcrits de CysLT1. Néanmoins, bien qu'une corrélation négative fût présentée entre l'expression du transcrit 2 dans les PBMC et la fréquence d'infections respiratoires aiguës dans la population asthmatique, l'expression du récepteur n'était pas explorée au niveau protéique ou fonctionnel. Enfin, l'absence de différences majeures entre les différentes populations étudiées amenaient les auteurs à proposer des régulations supplémentaires inconnues par des facteurs hormonaux et inflammatoires qui

pourraient avoir lieu au cours des exacerbations (Sokolowska *et al.*, 2009). Ici, nous montrons que l'IL-33, une cytokine abondamment produite au site inflammatoire, n'affecte pas l'expression du transcrit 2 mais des transcrits minoritaires 1 et 4. Ces deux transcrits avaient été ignorés dans les études précédentes car leur expression n'était pas détectée (Woszczek *et al.*, 2005). En effet, il nous était aussi difficile de les détecter avec les amorces publiées par Woszczek *et al.*, chevauchant les jonctions exoniques 1-2 et 1-3 (résultats non montrés). En revanche, à l'aide d'amorces spécifiques des exons 2 et 3, nous avons pu les amplifier et analyser leur expression. L'augmentation du ratio d'expression du transcrit 1 par rapport au transcrit 4 en réponse à l'IL-33 suggère une régulation différentielle de la stabilité de ces deux transcrits ou de l'épissage alternatif en faveur du transcrit 1 et au détriment du transcrit 4. En termes de séquence d'ARN, cette régulation se traduit par l'inclusion de l'exon 3 et l'exclusion de l'exon 2, avec conservation des exons 1, 4 et 5. À l'analyse *in silico* des séquences exoniques 2 et 3, des sites de liaisons pour différents régulateurs de l'épissage alternatif et de la stabilité de l'ARN ont été identifiés, proposant des cibles potentielles de l'IL-33 dans la régulation de l'expression du récepteur. De plus, des modifications dans la séquence primaire de l'ARNm peuvent aussi altérer des sites de modification chimiques (*e.g.* méthylations, pseudouridines) ou de reconnaissance d'ARN non-codants régulant la traduction ou la stabilité de l'ARNm (Genuth et Barna, 2018 ; Sanchez-Vasquez *et al.*, 2018). La séquence primaire peut aussi affecter la séquence secondaire et de façon indirecte l'accessibilité des RBPs ou des ARN non-codants à leurs séquences consensus. Ainsi, l'IL-33 pourrait augmenter l'expression protéique de CysLT1 en favorisant l'expression d'un transcrit alternatif plus stable et/ou plus accessible par la machinerie traductionnelle.

Pour déterminer le rôle des voies de synthèse protéique dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33, nous avons d'abord utilisé des inhibiteurs de la transcription (l'actinomycine D) et de la traduction (le cycloheximide). En présence d'actinomycine D, le niveau d'expression protéique était fortement augmenté. En tant qu'intercalant de l'ADN, l'actinomycine D bloque la transcription seulement, laissant la possibilité d'une synthèse protéique à partir des ARNm préformés. De plus, en inhibant la transcription, elle bloque aussi la synthèse des miRNA et peut donc retarder la dégradation de certains ARNm, favorisant leur traduction en protéine. Néanmoins, dans le même temps,

le niveau d'ARNm codant CysLT1 était drastiquement diminué, avec une demi-vie d'environ 3h, réduisant les chances d'une synthèse protéique. De plus, en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, le niveau protéique de CysLT1 était aussi augmenté. En revanche, l'actinomycine D et le cycloheximide sont des inhibiteurs non spécifiques des voies de synthèse protéique. Ils peuvent donc aussi bloquer la synthèse de protéines impliquées dans les processus de dégradation et ainsi favoriser l'accumulation protéique de CysLT1. De plus, en bloquant les processus de synthèse essentiels à la survie de la cellule, ces inhibiteurs activent des voies de stress cellulaire qui peuvent interférer avec les voies de dégradation protéique. Par exemple, l'actinomycine D induit un stress ribosomal qui se traduit par la liaison des protéines ribosomales RPL5, RPL11 et RPL23 à l'ubiquitine-ligase MDM2, inhibant celle-ci et diminuant la dégradation de p53 et p21 (Ashcroft *et al.*, 2000 ; Dai et Lu, 2004). Ainsi, l'actinomycine D augmente les niveaux protéiques de p53 et p21 (Ashcroft *et al.*, 2000 ; Dai et Lu, 2004). Dans la lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2, le cycloheximide a été décrit comme pouvant potentialiser la production d'IL-6 induite par l'IL-1 β en augmentant la stabilité de l'ARNm dépendamment de l'activation de NF- κ B et p38 (Hershko *et al.*, 2004). Dans cette étude, les auteurs concluaient que de faibles concentrations de cycloheximide (10 μ g/ml) stabilisaient l'ARNm alors que des concentrations plus élevées (1mg/ml) étaient nécessaires pour bloquer la traduction. Une telle conclusion a été appuyée par une étude de Dai *et al* qui montrait que le cycloheximide accélérerait la dégradation de p53 en augmentant l'activation de MDM2 par Akt dans des cellules HEK-293 (Dai *et al.*, 2013). Dans cette étude, les auteurs utilisaient des concentrations de 0.1 à 300 μ M, soit 28ng/ml à 84.5 μ g/ml, et montraient une diminution maximale de la quantité protéique totale à partir de 100 μ M (28 μ g/ml), reflétant une bonne efficacité à inhiber la traduction. Dans les lymphocytes du sang périphérique humain, une concentration de 5-20 μ g/ml est généralement utilisée pour inhiber la traduction tout en limitant la toxicité (Gavegnano *et al.*, 2014). En effet, la concentration de 10 μ g/ml a été validée au laboratoire pour diminuer efficacement la production d'autres protéines (données non présentées). En observant une augmentation de l'expression protéique de CysLT1, il semble donc que les concentrations efficaces du cycloheximide à bloquer la traduction ne dépendent pas seulement du type cellulaire, mais aussi de l'ARNm ou de la protéine d'intérêt.

Comme alternative à l'actinomycine D et au cycloheximide, et dans le but de bloquer plus spécifiquement la voie de synthèse de CysLT1, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre la séquence codante du récepteur. Bien que les siRNA spécifiques diminuassent jusqu'à 70% le niveau d'ARNm codant CysLT1 dans les expériences préliminaires, l'augmentation de l'expression protéique de CysLT1 par l'IL-33 n'était pas affectée. Ces résultats amènent à penser que l'IL-33 n'affecterait pas les voies de synthèse du récepteur CysLT1. Néanmoins, considérant la faible diminution du niveau d'ARNm dans ces dernières expériences (20% après 10h de nucléofection, Figure 3, E), nous ne pouvons pas exclure l'inefficacité des siRNA à bloquer une potentielle augmentation de traduction induite par l'IL-33. À l'analyse des transcrits alternatifs, le transcrit 2 était le plus fortement diminué par les siRNA, alors que les transcrits 1, 3 et 4 n'étaient diminués que de 10%. De façon intéressante, l'IL-33 rétablissait le niveau d'expression du transcrit 1. Bien que ces résultats ne soient que préliminaires et doivent être confirmés, ils appuient l'hypothèse selon laquelle l'IL-33 pourrait réguler l'épissage alternatif de CysLT1 ou la stabilité de ses transcrits alternatifs en favorisant l'expression du transcrit 1. L'utilisation de siRNA spécifiques du transcrit 1 sera nécessaire pour confirmer son rôle dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33. De plus la capacité de l'IL-33 à augmenter la traduction de CysLT1 devra être confirmée par d'autres approches telles que le profilage des polysomes.

Finalement, nous avons montré que malgré l'augmentation de l'expression basale de CysLT1 par les inhibiteurs des voies de dégradation protéiques, ceux-là ne bloquaient pas l'augmentation d'expression induite par l'IL-33. En effet, l'IL-33 et les inhibiteurs avaient un effet additif sur l'expression du récepteur. Ces résultats suggèrent que l'IL-33 n'augmente pas l'expression de CysLT1 en agissant sur les voies de dégradation et supportent une action sur les voies de production protéiques. Des expériences de profilage de polysomes et l'emploi de siRNA spécifiques de l'exon 3 seront nécessaires pour déterminer si cette augmentation de synthèse protéique est bien dépendante du transcrit 1. L'étude du profil de phosphorylation des cibles potentielles de l'IL-33 révélées par analyse *in silico* des exons 2 et 3, ainsi que leur liaison aux transcrits de CysLT1 pourront être explorées par Western blot

et immunoprécipitation de l'ARN (RIP), respectivement, et permettraient de définir les mécanismes par lesquels l'IL-33 augmente l'expression du transcrit 1 et de CysLT1.

En résumé, nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle l'IL-33 augmente la production protéique de CysLT1. Bien que les mécanismes impliqués restent imprécis, nos travaux proposent pour la première fois une régulation de l'expression différentielle des transcrits de CysLT1 par une cytokine.

Références

- Ali, S., Huber, M., Kollewe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., and Martin, M.U. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18660-18665.
- Ashcroft, M., Taya, Y., and Vousden, K.H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20, 3224-3233.
- Capra, V., Accomazzo, M.R., Gardoni, F., Barbieri, S., and Rovati, G.E. (2010). A role for inflammatory mediators in heterologous desensitization of CysLT1 receptor in human monocytes. *J Lipid Res* 51, 1075-1084.
- Cayrol, C., Duval, A., Schmitt, P., Roga, S., Camus, M., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., Gonzalez-de-Peredo, A., and Girard, J.P. (2018). Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat Immunol* 19, 375-385.
- Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179, 2551-2555.
- Cook, K.B., Kazan, H., Zuberi, K., Morris, Q., and Hughes, T.R. (2011). RBPDB: a database of RNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res* 39, D301-308.
- Dahlen, S.E., Hedqvist, P., Hammarstrom, S., and Samuelsson, B. (1980). Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288, 484-486.
- Dai, C.L., Shi, J., Chen, Y., Iqbal, K., Liu, F., and Gong, C.X. (2013). Inhibition of protein synthesis alters protein degradation through activation of protein kinase B (AKT). *J Biol Chem* 288, 23875-23883.
- Dai, M.S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 279, 44475-44482.
- Dvinge, H. (2018). Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. *FEBS Lett.*
- Early, S.B., Barekzi, E., Negri, J., Hise, K., Borish, L., and Steinke, J.W. (2007). Concordant modulation of cysteinyl leukotriene receptor expression by IL-4 and IFN-gamma on peripheral immune cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 715-720.
- Figueroa, D.J., Breyer, R.M., Defoe, S.K., Kargman, S., Daugherty, B.L., Waldburger, K., Liu, Q., Clements, M., Zeng, Z., O'Neill, G.P., *et al.* (2001). Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 226-233.
- Fregonese, L., Silvestri, M., Sabatini, F., and Rossi, G.A. (2002). Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. *Clin Exp Allergy* 32, 745-750.
- Gavegnano, C., Detorio, M., Montero, C., Bosque, A., Planelles, V., and Schinazi, R.F. (2014). Ruxolitinib and tofacitinib are potent and selective inhibitors of HIV-1 replication and virus reactivation in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1977-1986.
- Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat Rev Genet.*

- Gopfert, C., Andreas, N., Weber, F., Hafner, N., Yakovleva, T., Gaestel, M., Kamradt, T., and Drube, S. (2018). The p38-MK2/3 Module Is Critical for IL-33-Induced Signaling and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Immunol* 200, 1198-1206.
- Haeggstrom, J.Z., and Funk, C.D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111, 5866-5898.
- Han, L., Zhang, M., Liang, X., Jia, X., Jia, J., Zhao, M., and Fan, Y. (2017). Interleukin-33 promotes inflammation-induced lymphangiogenesis via ST2/TRAFF6-mediated Akt/eNOS/NO signalling pathway. *Sci Rep* 7, 10602.
- Heise, C.E., O'Dowd, B.F., Figueroa, D.J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D.S., Stocco, R., Bellefeuille, J.N., Abramovitz, M., Cheng, R., *et al.* (2000). Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275, 30531-30536.
- Hershko, D.D., Robb, B.W., Wray, C.J., Luo, G.J., and Hasselgren, P.O. (2004). Superinduction of IL-6 by cycloheximide is associated with mRNA stabilization and sustained activation of p38 map kinase and NF-kappaB in cultured caco-2 cells. *J Cell Biochem* 91, 951-961.
- Ichiyama, T., Kajimoto, M., Hasegawa, M., Hashimoto, K., Matsubara, T., and Furukawa, S. (2007). Cysteinyl leukotrienes enhance tumour necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy* 37, 608-614.
- Jackson, D.J., Makrinioti, H., Rana, B.M., Shamji, B.W., Trujillo-Torralbo, M.B., Footitt, J., Jerico, D.-R., Telcian, A.G., Nikonova, A., Zhu, J., *et al.* (2014). IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 190, 1373-1382.
- Kanaoka, Y., Maekawa, A., and Austen, K.F. (2013). Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* 288, 10967-10972.
- Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 20, 791-800.
- Lefrancais, E., and Cayrol, C. (2012). Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23, 120-127.
- Lynch, K.R., O'Neill, G.P., Liu, Q., Im, D.S., Sawyer, N., Metters, K.M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D.J., Zeng, Z., *et al.* (1999). Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399, 789-793.
- Makrinioti, H., Toussaint, M., Jackson, D.J., Walton, R.P., and Johnston, S.L. (2014). Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir Med* 2, 226-237.
- Moritz, D.R., Rodewald, H.R., Gheyselinck, J., and Klemenz, R. (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* 161, 4866-4874.
- Mun, S.H., Ko, N.Y., Kim, H.S., Kim, J.W., Kim, D.K., Kim, A.R., Lee, S.H., Kim, Y.G., Lee, C.K., Lee, S.H., *et al.* (2010). Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci* 67, 3883-3892.

- Naik, S., Billington, C.K., Pascual, R.M., Deshpande, D.A., Stefano, F.P., Kohout, T.A., Eckman, D.M., Benovic, J.L., and Penn, R.B. (2005). Regulation of cysteinyl leukotriene type 1 receptor internalization and signaling. *J Biol Chem* 280, 8722-8732.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.* (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367-1370.
- Ohh, M., and Takei, F. (1995). Regulation of ICAM-1 mRNA stability by cycloheximide: role of serine/threonine phosphorylation and protein synthesis. *J Cell Biochem* 59, 202-213.
- Parhamifar, L., Sime, W., Yudina, Y., Vilhardt, F., Morgelin, M., and Sjolander, A. (2010). Ligand-induced tyrosine phosphorylation of cysteinyl leukotriene receptor 1 triggers internalization and signaling in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 5, e14439.
- Parmentier, C.N., Fuerst, E., McDonald, J., Bowen, H., Lee, T.H., Pease, J.E., Woszczek, G., and Cousins, D.J. (2012). Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1136-1142.
- Peine, M., Marek, R.M., and Lohning, M. (2016). IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol* 37, 321-333.
- Prefontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemiere, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183, 5094-5103.
- Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Senglali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 752-754.
- Rank, M.A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K.R., Squillace, D.L., and Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1047-1054.
- Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2007). Cytokine-leukotriene receptor interactions. *ScientificWorldJournal* 7, 1348-1358.
- Salmond, R.J., Mirchandani, A.S., Besnard, A.G., Bain, C.C., Thomson, N.C., and Liew, F.Y. (2012). IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1159-1166 e1156.
- Sanchez-Vasquez, E., Alata Jimenez, N., Vazquez, N.A., and Strobl-Mazzulla, P.H. (2018). Emerging role of dynamic RNA modifications during animal development. *Mech Dev*.
- Sarau, H.M., Ames, R.S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Muccitelli, R.M., Jenkins, O., Murdock, P.R., *et al.* (1999). Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56, 657-663.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.
- Shirasaki, H., Kanaizumi, E., and Himi, T. (2017). Leukotriene D4 induces chemotaxis in human eosinophilic cell line, EoL-1 cells via CysLT1 receptor activation. *Heliyon* 3, e00464.

- Shirasaki, H., Kanaizumi, E., Watanabe, K., Matsui, T., Sato, J., Narita, S., Rautiainen, M., and Himi, T. (2002). Expression and localization of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* 32, 1007-1012.
- Sirois, P., and Borgeat, P. (1980). From slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) to leukotriene D4 (LTD4). *Int J Immunopharmacol* 2, 281-293.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20, 1019-1030.
- Sokolowska, M., Wodz-Naskiewicz, K., Cieslak, M., Seta, K., Bednarek, A.K., and Pawliczak, R. (2009). Variable expression of cysteinyl leukotriene type I receptor splice variants in asthmatic females with different promoter haplotypes. *BMC Immunol* 10, 63.
- Takasaki, J., Kamohara, M., Matsumoto, M., Saito, T., Sugimoto, T., Ohishi, T., Ishii, H., Ota, T., Nishikawa, T., Kawai, Y., *et al.* (2000). The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 316-322.
- Thivierge, M., Doty, M., Johnson, J., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2000). IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165, 5221-5226.
- Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2001). IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167, 2855-2860.
- Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2006). Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1155-1162.
- Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2009). Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: involvement of IL-10 and prostaglandins. *J Immunol* 183, 6778-6787.
- Thivierge, M., Turcotte, S., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2015). Enhanced cysteinyl-leukotriene type 1 receptor expression in T cells from house dust mite-allergic individuals following stimulation with Der p. *J Immunol Res* 2015, 384780.
- Woszczek, G., Chen, L.Y., Nagineni, S., Kern, S., Barb, J., Munson, P.J., Logun, C., Danner, R.L., and Shelhamer, J.H. (2008). Leukotriene D(4) induces gene expression in human monocytes through cysteinyl leukotriene type I receptor. *J Allergy Clin Immunol* 121, 215-221 e211.
- Woszczek, G., Pawliczak, R., Qi, H.Y., Nagineni, S., Alsaaty, S., Logun, C., and Shelhamer, J.H. (2005). Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol* 175, 5152-5159.
- Zhiguang, X., Wei, C., Steven, R., Wei, D., Wei, Z., Rong, M., Zhanguo, L., and Lianfeng, Z. (2010). Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett* 131, 159-165.

DISCUSSION

1. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE CysLT1 PAR L'IL-33

Dans le premier chapitre, nous avons montré que l'axe IL-33/ST2L/TAK-1 augmente l'expression de CysLT1 au niveau protéique mais pas au niveau transcriptionnel, suggérant une régulation au niveau post-transcriptionnel. Dans le deuxième chapitre, nous avons montré une augmentation du ratio d'expression du transcrit 1 de CysLT1 par rapport au transcrit 4, suggérant une régulation de l'épissage alternatif en faveur d'un transcrit avec une meilleure efficacité de traduction. De la signalisation du récepteur ST2L à l'augmentation du niveau protéique de CysLT1, plusieurs mécanismes de régulation et approches exploratoires peuvent être envisagés.

1.1. Régulation post-transcriptionnelle de CysLT1

1.1.1. *L'IL-33 augmente-t-elle la traduction du récepteur CysLT1 ?*

Les résultats présentés dans le deuxième chapitre indiquent une régulation des niveaux d'expression des transcrits alternatifs de CysLT1 par l'IL-33 et confortent une action de la cytokine au niveau post-transcriptionnel. Néanmoins, les transcrits 1 et 4 ne sont que faiblement exprimés comparativement aux transcrits 2 et 3, et leur modulation est faible. Il est donc essentiel de confirmer l'action de la cytokine sur l'efficacité de traduction de CysLT1. La technique du profilage des polysomes est une méthode qui permet de mesurer l'enrichissement d'un transcrit d'intérêt dans les fractions polysomales, donc plus susceptible d'être traduit. Elle a l'avantage d'éviter l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique qui peuvent biaiser le niveau d'expression de la protéine d'intérêt au cours de la stimulation avec l'IL-33, et permet d'analyser chaque transcrit alternatif individuellement. Par la suite, l'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre le transcrit 1 permettra d'établir le lien de cause à effet entre sa régulation par l'IL-33 et l'augmentation de l'expression protéique de CysLT1.

1.1.2. *Comment l'IL-33 régule-t-elle les niveaux d'expression des transcrits 1 et 4 ?*

1.1.2.1. *Épissage alternatif*

L'épissage est le processus par lequel les introns et exons sont retirés et retenus, respectivement, du pré-ARNm pour former l'ARNm mature. L'épissage alternatif consiste

en la rétention de différents exons à partir d'un même pré-ARNm, pour donner différents ARNm matures, dits transcrits alternatifs. Le processus d'épissage est opéré par le spliceosome composé de 6 complexes ribonucléoprotéiques, et dirigé par diverses protéines de régulation dont les protéines SR (protéines riches en Sérine et Arginine – *Serine-Arginine rich proteins*) et les hnRNP (Riboprotéines nucléaires hétérogènes – *heterogeneous nuclear riboproteins*) (Dvinge, 2018). L'épissage alternatif peut être influencé par de nombreux facteurs tels que la composition du spliceosome, la nature des facteurs d'épissages ou les RBPs (Protéines liant l'ARN – *RNA-binding proteins*) recrutées par le pré-ARNm. De façon intéressante, une analyse *in silico* des exons 2 et 3 de *CYSLT1* a révélé principalement des sites de liaison pour des facteurs de régulation de l'épissage (SFRS1, SFRS9, SFRS13A, ZRANB2, KHDRBS3). Étant différents pour les deux transcrits, ces facteurs pourraient être proposés comme cibles de régulation de l'épissage alternatif de *CYSLT1* en réponse à l'IL-33 et leur recrutement au niveau des transcrits de CysLT1 peut être confirmée par co-immunoprécipitation de l'ARN. Enfin, la majorité des processus d'épissage étant co-transcriptionnels, d'autres éléments de régulation peuvent être considérés tels que l'ARN-polymérase II, la conformation de la chromatine ou les marques épigénétiques (méthylations et acétylations des histones) qui participent au recrutement des facteurs d'épissages directement ou indirectement en affectant la vitesse d'élongation du transcrit et sa conformation (Dvinge, 2018).

1.1.2.2. Export au réticulum endoplasmique et stabilité des transcrits

Une fois synthétisé et mûré, le nouveau transcrit doit être exporté du noyau cellulaire vers le cytoplasme et adressé au réticulum pour être traduit ou aux granules de ribonucléoprotéines (e.g. P-bodies, granules de stress) pour être stocké ou dégradé (Buchan, 2014; Sfakianos *et al.*, 2016). Ce processus dynamique permet un contrôle rapide du niveau de transcrit et implique le recrutement de RBPs spécifiques régulées par les stimuli exogènes (Buchan, 2014; McCormick et Khapersky, 2017). Bien que l'augmentation du ratio d'expression du transcrit 1 de CysLT1 par rapport au transcrit 4 suggère plus intuitivement l'exclusion de l'exon 2 au profit de l'exon 3 au cours du processus d'épissage alternatif, l'hypothèse d'une régulation d'une stabilisation du transcrit 1 concomitante à une dégradation du transcrit 4 ne peut pas être exclue d'après les résultats présentés.

1.1.3. Comment l'altération du ratio transcrit 1/4 peut-elle affecter la traduction de CysLT1 ?

Les transcrits alternatifs de CysLT1 se différencient par leurs régions non traduites 5'-UTR. De la même façon que le promoteur régule la transcription d'un gène, la région 5'-UTR régule la traduction opérée par les ribosomes au niveau du réticulum endoplasmique. La traduction peut être contrôlée par plusieurs facteurs *cis*-régulateurs et *trans*-régulateurs. Les facteurs *cis*-régulateurs intrinsèques à l'ARNm comprennent les motifs de liaison des RBPs, la structure de l'ARN (*e.g.* formation d'IRES – *Internal ribosome entry site*) et les modifications chimiques des acides nucléiques (méthylations, pseudouridylations) (Genuth et Barna, 2018; Sanchez-Vasquez *et al.*, 2018). De ces facteurs *cis*-régulateurs dépend le recrutement du ribosome et des facteurs *trans*-régulateurs. Les ribosomes peuvent affecter l'efficacité de traduction par leur composition et l'abondance de certains ARNr et protéines qui les constituent (Genuth et Barna, 2018). Enfin, les facteurs *trans*-régulateurs comprennent un large éventail de RBPs qui régulent la stabilité de l'ARNm et le recrutement des ribosomes. L'analyse des séquences des exons 2 et 3 propose peu ou pas de sites de liaison de RBPs connues pour réguler directement la traduction. Néanmoins, la base de données utilisée pour cette analyse ne répertorie que 272 RBPs (Cook *et al.*, 2011), ce qui est peu considérant les milliers de facteurs impliqués dans les processus de régulation post-transcriptionnels (Dvinge, 2018; Genuth et Barna, 2018). De plus, les facteurs d'épissage sont parmi les RBPs ayant été les plus étudiées et les mieux décrites, il est donc aisément envisageable que des RBPs non caractérisées à ce jour et impliquées dans d'autres processus n'aient pas été révélées dans cette analyse. Une approche alternative pour identifier des partenaires d'interaction des transcrits de CysLT1 serait d'immuno-précipiter les transcrits à l'aide d'une sonde nucléique spécifique et étiquetée, puis d'analyser les profils des RBPs co-immuno-précipitées par spectrométrie de masse.

La structure de l'ARNm est un élément clé de la régulation de la maturation, de sa stabilité et de l'efficacité de traduction (Liu *et al.*, 2016). D'un côté, le repliement et l'interaction des extrémités 5' et 3' est nécessaire au capping et à la polyadénylation essentiels à la stabilité de l'ARNm (Liu *et al.*, 2016). D'un autre côté, la structure doit être assez lâche pour permettre un dépliement peu énergivore de l'ARNm favorisant une bonne efficacité de traduction (Liu *et al.*, 2016; Mustoe *et al.*, 2018). Il n'est pas exclu que ces

exons puissent modifier la structure de l'ARNm, l'accès à des motifs de liaison sur des exons plus distants et ainsi le niveau de traduction du récepteur CysLT1. Une analyse différentielle des structures des transcrits 1 et 4 serait intéressante pour élucider cette question.

1.2. Signalisation du récepteur ST2L

En régulant l'expression ou l'activation des RBPs, du spliceosome et des ribosomes, les stimuli extracellulaires et intracellulaires peuvent réguler l'activité traductionnelle. L'intégration de ces stimuli passe par plusieurs voies de signalisation dont la principale est celle de la sérine/thréonine kinase mTOR. En effet, au sein du complexe mTORC1 sensible à la rapamycine, mTOR joue un rôle pivot dans l'activation des facteurs d'initiation de la traduction en réponse aux hormones, facteurs de croissance, cytokines, nutriments, métabolites ou au statut énergétique (Roux et Topisirovic, 2018).

1.2.1. Comment l'IL-33 active-t-elle mTOR ?

MTORC1 est un complexe protéique composé de la kinase mTOR ainsi que de la protéine adaptatrice RAPTOR (*Regulatory-associated protein of mTOR*), la GTPase mLST8, et de pator (*disheveled, Egl-10, pleckstrin [DEP] domain-containing mTOR-interacting protein*). MTORC1 est activé par la petite GTPase Rheb, elle-même inhibée par le complexe TSC (*Tuberous sclerosis complex*), composé de TSC1 et TSC2. L'inhibition de Rheb est levée lorsque TSC2 est phosphorylé, et les principales voies décrites de sa phosphorylation en réponse aux hormones et facteurs de croissance sont PI3K/PDK1/Akt et Ras/Raf/MEK/ERK(/RSK) (Roux et Topisirovic, 2018). Dans le chapitre 1, nous avons montré que ERK1/2 n'était pas activé par l'IL-33 dans les lymphocytes humains et que les inhibiteurs de PI3K et des voies des MAPKs ne bloquaient pas l'augmentation d'expression de CysLT1 induite par l'IL-33, suggérant que mTOR serait activé par une autre voie.

La sirtuine-1 (SIRT1), une histone désacétylase dépendante du NAD⁺, a la capacité d'inhiber mTOR en s'associant à TSC2 (Ghosh *et al.*, 2010). Au cours de la différenciation des lymphocytes Th9, Wang *et al* ont montré que l'activation de TAK-1 par le TGF-β transduisait la répression de SIRT1 et ainsi l'activation de mTOR (Wang *et al.*, 2016). Bien que nous n'ayons pas démontré que TAK-1 et mTOR prenaient part à une même voie de signalisation du récepteur ST2L, SIRT1 pourrait constituer un chaînon manquant dans la potentielle activation de mTOR par TAK-1.

1.2.2. Comment TAK-1 et mTORC1 peuvent-ils réguler la traduction de CysLT1 ?

mTORC1 peut promouvoir la traduction en régulant l'activation des facteurs d'initiation eucaryotes (eIF). EIF4E, eIF4G et eIF4A composent le complexe eIF4F qui permet le recrutement des ARNm au ribosome. EIF4E peut être régulé négativement via la séquestration par les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2 (*eIF4E-binding proteins*), ou positivement par la kinase MNK1 (Raught et Gingras, 1999).

En phosphorylant les 4E-BPs, mTORC1 lève l'inhibition de celui-ci sur eIF4E (Roux et Topisirovic, 2018). Des expériences préliminaires nous indiquent que la rapamycine ne bloque que faiblement la phosphorylation de eIF4E induite par l'IL-33 (Résultats non montrés). La rapamycine, un inhibiteur allostérique de mTORC1, se loge dans la poche du site catalytique de mTOR. Néanmoins, elle ne remplit pas tout le site, donc l'inhibition est plus ou moins totale selon les substrats. Ainsi, il a été montré que la rapamycine bloque bien la phosphorylation de p70S6K, mais seulement partiellement celle des 4E-BPs (Choo *et al.*, 2008). En accord, nos résultats suggèrent que eIF4E pourrait au moins en partie être activée par la voie de mTOR. De plus, si eIF4E est bel et bien impliqué dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33, l'inhibition partielle du facteur de traduction pourrait expliquer l'inhibition seulement partielle de l'augmentation de l'expression de CysLT1 par la rapamycine.

Par ailleurs, eIF4E peut être activé par les kinases MNK1/2, elles-mêmes activées par p38 ou ERK1/2 (Pyronnet, 2000; Raught et Gingras, 1999). Nos résultats montrent qu'un inhibiteur de p38 (SB203580) ne bloque pas l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33. En revanche, l'inhibiteur de TAK-1, kinase décrite pour activer la voie de p38 en aval du récepteur ST2L, bloque l'augmentation de l'expression de CysLT1 induite par l'IL-33 et abroge complètement la phosphorylation de eIF4E (Résultats non montrés), même dans la condition non-traitée à l'IL-33. Une coopération des voies de p38 et mTOR dans l'activation de eIF4E par l'IL-33 n'est donc pas exclue et peut être vérifiée en combinant les inhibiteurs de p38 et mTOR.

Finalement, le rôle de eIF4E dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'axe IL-33/ST2L/TAK-1 devra être démontré. En effet, une limite s'impose dans ce modèle, à savoir comment l'activation très transitoire de eIF4E après 90min peut-elle être directement responsable de la synthèse protéique de CysLT1 après 9h de stimulation. De plus, les

résultats obtenus avec l'actinomycine D, ne nous permettent pas d'écarter l'hypothèse d'une implication de l'activité transcriptionnelle dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33. Considérant les résultats présentés, une action indirecte de la voie mTOR/eIF4E sur l'augmentation de l'expression de CysLT1 doit être envisagée.

1.3. Sous-populations lymphocytaires

Dans le premier chapitre, nous avons montré que l'IL-33 augmente l'expression de CysLT1 (1) dans toutes les populations lymphocytaires et (2) en agissant de façon directe sur les cellules T naïves purifiées. Il serait tentant de conclure à un mécanisme direct sur chaque population mais des expériences avec des populations purifiées sont requises pour en être certain.

Suivant le même raisonnement, bien que l'augmentation de CysLT1 par l'IL-33 soit dépendante de l'activation de TAK-1 et engage partiellement la voie de signalisation du calcium et de mTOR dans les lymphocytes totaux, ce mécanisme n'a pas été directement démontré dans les cellules naïves purifiées. La signalisation du récepteur ST2L dans les lymphocytes a été très peu étudié. Guo *et al* ont montré que la production d'IL-13 en réponse à IL-33 dans les lymphocytes polarisés Th2 était dépendante de NF- κ B et de p38 (Guo *et al.*, 2009). Néanmoins, dans cette étude, les cellules étaient préalablement polarisées et étaient co-stimulées avec de l'IL-2, pouvant interférer dans la signalisation de l'IL-33 (Guo *et al.*, 2009). À notre connaissance, aucune étude n'a exploré la signalisation du récepteur ST2L dans des lymphocytes du sang périphérique humain. Ici, nous montrons que l'IL-33 induit l'activation de p38 et de eIF4E, et l'inhibition de l'augmentation de l'expression de CysLT1 par les inhibiteurs de TAK-1 et mTOR suggèrent l'implication d'une activation de ces kinases. Des expériences supplémentaires sont toutefois requises pour déterminer si ces voies de signalisation et les mécanismes signalétiques impliqués dans l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 sont les mêmes dans toutes les populations lymphocytaires.

2. SENSIBILITÉ DES CELLULES T NAÏVES À L'IL-33

2.1. Expression de ST2L

L'expression du récepteur ST2L a été décrite dans les lymphocytes activés Th2/Treg et Th1 où elle est augmentée sous le contrôle des facteurs de transcription GATA-3/STAT5

et T-bet/STAT4, respectivement (Baumann *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2009; Peine *et al.*, 2016). En revanche, ST2L n'a jamais été détecté à la surface des cellules T naïves par cytométrie en flux (Chan *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2009; Meisel *et al.*, 2001). Plus récemment, Gordon *et al.* ont révélé l'expression du récepteur à la surface des lymphocytes du sang périphérique humain (Gordon *et al.*, 2016). Dans cette étude, les lymphocytes CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD4⁻ exprimaient le même niveau de ST2L. De plus, le profil d'expression ne révélait pas de sous-population plus enrichie ou plus pauvre en récepteur (Gordon *et al.*, 2016). Ces données suggèrent que les lymphocytes du sang périphérique au repos expriment faiblement et de façon homogène le récepteur ST2L. Appuyant cette hypothèse, bien que les niveaux d'ARNm étaient plus faibles dans les lymphocytes naïfs comparativement aux lymphocytes T CD4⁺, nous avons détecté une faible expression de ST2L au niveau protéique par western blot dans les deux populations. Enfin, les lymphocytes naïfs purifiés répondaient à l'IL-33, confirmant l'expression de ST2L et la capacité des cellules T naïves à répondre directement à l'IL-33.

2.2. Pertinence

L'IL-33 *per se* ne suffit pas à induire la production de cytokines polarisantes par les lymphocytes naïfs. Cette observation, ainsi que la non-détection du récepteur ont amené une majorité de la communauté scientifique à penser que ces cellules sont insensibles à l'IL-33. Or, les résultats présentés ici montrent pour la première fois que les cellules T naïves sont sensibles à l'IL-33 et capables d'y répondre, notamment en augmentant l'expression de CysLT1.

Les lymphocytes peuvent moduler la réponse inflammatoire en produisant des cytokines, mais aussi des chimiokines ou en exprimant des récepteurs aux chimiokines. En effet, la capacité chimiotactique des lymphocytes T est indispensable à l'établissement d'une réponse inflammatoire localisée et contrôlée (Islam et Luster, 2012). Au cours d'études exploratoires, CysLT1 s'est révélé être le seul récepteur dont l'expression était affectée par l'IL-33. Des récepteurs tels que CCR3, CCR5, CCR7, CXCR3 ou CXCR4 n'étaient pas modulés. Néanmoins, cette liste n'est pas exhaustive des récepteurs exprimés par les lymphocytes et il n'est pas exclu que l'IL-33 puisse affecter l'expression d'autres protéines. De plus, en mobilisant des voies de signalisation telles que p38 ou mTOR, l'alarmine peut prédisposer la cellule à répondre plus fortement ou plus faiblement à d'autres stimuli de

l'environnement inflammatoire. Ainsi, à l'aide de méthodes haut débit telles que des puces d'expression ou du SILAC, il serait intéressant d'étudier plus largement la réponse des lymphocytes T naïfs à l'IL-33 et l'effet d'un prétraitement à l'IL-33 sur la réponse des lymphocytes T naïfs à des stimuli polarisants. Les résultats de ces expériences permettraient d'avoir une vue d'ensemble des processus cellulaires régulés par l'IL-33 dans les lymphocytes non activés.

3. COLLABORATION DE L'IL-33 ET DES CysLTs DANS L'ASTHME

3.1. Recrutement et activation des lymphocytes T *in situ*

L'IL-33 et les cysLTs sont des facteurs chimio-attractants pour les lymphocytes Th2 qui surexpriment les récepteurs ST2L et CysLT1 (Komai-Koma *et al.*, 2007; Parmentier *et al.*, 2012). L'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 à la surface des lymphocytes T naïfs et mémoires au repos, accompagnée de l'augmentation de leur capacité migratoire en réponse au LTD₄, suggère une coopération entre l'alarmine et les médiateurs lipidiques dans le recrutement des lymphocytes circulants à la muqueuse bronchique asthmatique.

Les lymphocytes mémoires peuvent être activés *in situ* par les cellules présentatrices d'antigène et les cytokines telles que l'IL-33 elle-même (Guo *et al.*, 2015). L'activation des lymphocytes T naïfs a longtemps été considérée comme n'ayant lieu qu'au ganglion lymphatique après migration et maturation des cellules dendritiques (Kawakami *et al.*, 2012; Plantinga *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2006). Récemment, l'activation des cellules T naïves dans la muqueuse bronchique a été suggérée au niveau des organes lymphoïdes tertiaires ou iBALT (Choi *et al.*, 2017). En induisant l'infiltration des lymphocytes naïfs, l'IL-33 et les cysLTs pourraient donc indirectement favoriser leur activation *in situ* (Figure 1).

3.2. Polarisation de la réponse inflammatoire

L'IL-33 et les cysLTs ne permettent pas à eux seuls d'induire directement la polarisation des lymphocytes T naïfs. En revanche, ils ont la capacité de cibler divers acteurs de l'immunité innée capables de modeler un environnement inflammatoire propice à leur activation.

En agissant directement sur les cellules de l'immunité innée (mastocytes, basophiles, ILC2s), l'IL-33 induit la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 favorables à l'immunité de type 2 (Allakhverdi *et al.*, 2007; Salmond *et al.*, 2012; Smithgall *et al.*, 2008). De même, les cysLTs participent à l'infiltration des éosinophiles (Fregonese *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004), à la prolifération des mastocytes (Jiang *et al.*, 2007) et à la production des cytokines IL-4 et IL-5 (Bandeira-Melo *et al.*, 2002; Mellor *et al.*, 2002).

L'IL-33 ne suffit pas à induire la dégranulation et la production de cysLTs par les granulocytes, mais augmente la libération de cysLTs induite par les IgE dans les basophiles du sang périphérique humain (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009). De plus, le LTC₄ augmente l'activation des ILC2s induite par l'IL-33, dépendamment du récepteur CysLT1 (Lund *et al.*, 2017; von Moltke *et al.*, 2017). Enfin, dans un modèle murin d'intolérance à l'aspirine, l'inflammation de type 2 induite par le LTC₄ *via* le récepteur CysLT2 est partiellement bloquée en présence d'un anticorps bloquant anti-IL-33 (Liu *et al.*, 2018). Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces observations ne soient pas complètement élucidés, ces résultats ainsi que ceux présentés dans cette thèse confirment une coopération de l'IL-33 et des cysLTs dans l'établissement de l'environnement inflammatoire de type 2.

Lorsqu'administrés séparément, l'IL-33 et les cysLTs ont aussi la capacité d'induire la production d'autres cytokines polarisantes telles que l'IFN γ , l'IL-1 β , l'IL-6, le TGF β (Bosse *et al.*, 2008; Perng *et al.*, 2006; Smithgall *et al.*, 2008; Stolarski *et al.*, 2010). L'IL-33 a aussi la propriété de potentialiser l'activation des lymphocytes Th1, Th17, Th9 et Treg (Blom *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012; Peine *et al.*, 2016). Des études supplémentaires sont requises pour évaluer le rôle physiopathologique de ces modulations dans l'asthme, ainsi qu'une potentielle synergie de l'IL-33 et des cysLTs dans l'établissement de ces profils inflammatoires.

3.3. Rôle des lymphocytes T ST2⁺ dans l'asthme

Le rôle pathogénique de l'IL-33 dans le processus inflammatoire asthmatique et l'activation des lymphocytes Th2 est indéniable (Louten *et al.*, 2011; Makrinioti *et al.*, 2014; Mizutani *et al.*, 2013). Pourtant, au moins deux études ont montré un rôle protecteur des lymphocytes T ST2⁺ dans l'asthme (Kondo *et al.*, 2008; Mangan *et al.*, 2007).

Dans deux modèles d'hypersensibilité induite à l'ovalbumine ou par l'administration intranasale d'IL-33, le transfert adoptif de cellules Th2 ST2^{-/-} ou l'absence de cellules T

(génotype RAG^{-/-}), respectivement, conduit à une augmentation de la production d'IL-5 et de l'infiltration éosinophilique (Kondo *et al.*, 2008; Mangan *et al.*, 2007). Dans le but de maintenir un certain équilibre immunitaire, l'activation des lymphocytes *in vivo* s'accompagne de la différenciation d'un pool plus ou moins important de lymphocytes Treg (Chaudhry et Rudensky, 2013; Eberl, 2016). Or, en forçant la polarisation des lymphocytes Th2 *ex vivo* ou en absence de lymphocytes endogènes, la formation de cette population tolérante peut être limitée (Siede *et al.*, 2016). De plus, l'IL-33 peut induire une inflammation des voies respiratoires indépendamment des lymphocytes T en ciblant les ILC2s (Salmond *et al.*, 2012), il n'est donc pas exclu que l'absence de cellules régulatrices puisse conduire à une suractivation des ILC2s.

En favorisant l'infiltration de cellules T naïves dans la muqueuse bronchique, l'IL-33 et les cysLTs peuvent donc contribuer à l'activation des lymphocytes Th2 pathogéniques et des lymphocytes Treg protecteurs (Figure 1).

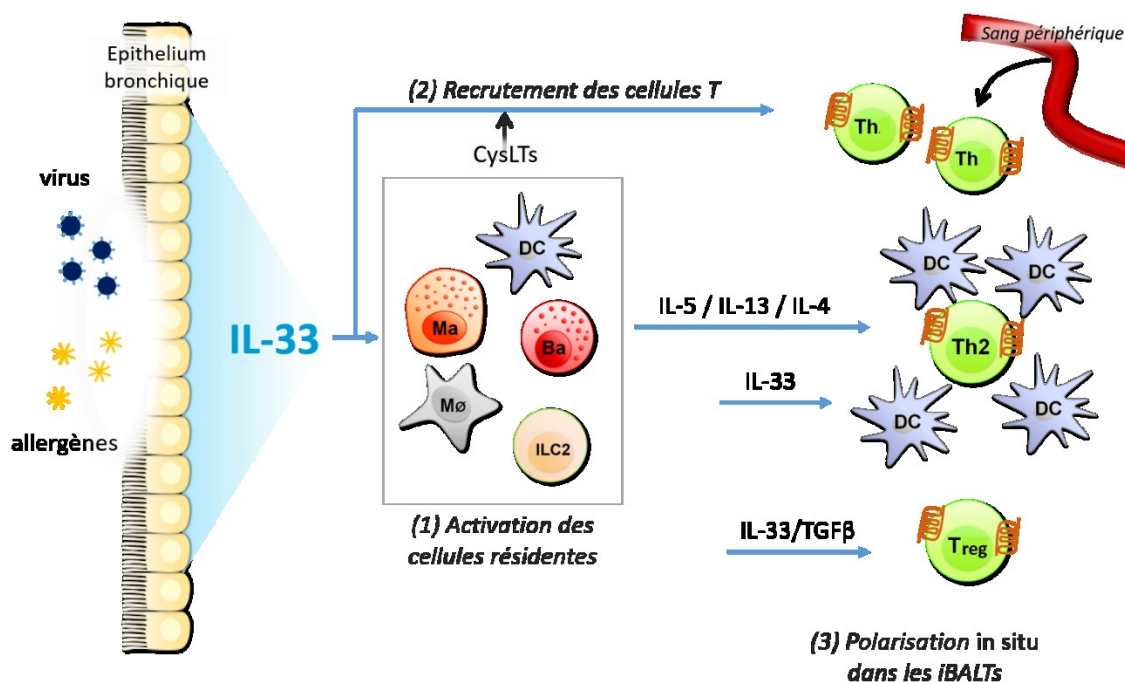


Figure 1. Coopération de l'IL-33 et des cysLTs dans le recrutement et l'activation des lymphocytes T du sang périphérique humain. En réponse aux virus ou allergènes, l'IL-33 et autres alarmines sont libérées dans la muqueuse bronchique et activent les cellules immunitaires résidentes, conduisant à la production de médiateurs lipidiques et de cytokines polarisantes (1). L'IL-33 et les cysLTs produits participent au recrutement des lymphocytes T du sang périphérique (2). Ces derniers peuvent être activés au niveau des tissus lymphoïdes tertiaire (iBALT), dépendamment de l'environnement cytokinique majoritaire (3).

3.4. Perspectives

3.4.1. Confirmation du modèle in vivo

Nous proposons que l'IL-33 pourrait augmenter l'infiltration des cellules T naïves à la muqueuse bronchique en augmentant l'expression du récepteur CysLT1 à leur surface.

Dans l'étude de Mangan *et al.*, l'administration de lymphocytes Th2 ST2^{-/-} conduisait à une diminution drastique du nombre de cellules mononucléées dans le liquide bronchoalvéolaire (Mangan *et al.*, 2007). Ce résultat supporte ceux de Komai-Koma *et al.* qui avaient mis en évidence la chimiotaxie des lymphocytes Th2 en réponse à l'IL-33 *in vitro* (Komai-Koma *et al.*, 2007). Néanmoins, les cellules mononucléées comprennent les lymphocytes et les monocytes, et le rôle de la cytokine dans l'infiltration des cellules T spécifiquement n'a jamais été vérifié *in vivo*.

Le rôle de CysLT1 dans l'infiltration des cellules T au poumon n'a jamais été exploré et pourrait être vérifié en procédant au transfert adoptif de lymphocytes T CD45.1⁺ CD4⁺ de type sauvage ou déficients en CysLT1 vers une souris de génotype CD45.2. Ainsi l'infiltration des cellules déficientes en CysLT1 serait comparée à l'infiltration des cellules de type sauvage, en condition homéostatique ou suite à un challenge avec un allergène.

L'IL-33 et les cysLTs induisent aussi la production d'autres chimiokines et l'expression d'autres récepteurs aux chimiokines (Allakhverdi *et al.*, 2007; Ichiyama *et al.*, 2009; Ichiyama *et al.*, 2005; Kawano *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009; Provost *et al.*, 2012; Smithgall *et al.*, 2008; Stolarski *et al.*, 2010; Suzukawa *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2006). Ils peuvent donc induire l'infiltration lymphocytaire directement ou indirectement. De plus, la redondance fonctionnelle des chimiokines permet de compenser l'absence de l'une en surexprimant l'autre (Lukacs *et al.*, 1999; Mantovani, 1999). Enfin, les lymphocytes T ne sont pas indispensables à l'induction d'une réponse inflammatoire par l'IL-33 (Kondo *et al.*, 2008; Salmond *et al.*, 2012). Ces éléments peuvent donc rendre difficile d'évaluer *in vivo* le rôle imputé spécifiquement à CysLT1 ou à l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 dans l'infiltration des lymphocytes à la muqueuse bronchique.

3.4.2. Donneurs allergiques et/ou asthmatiques

La cohorte de donneurs étudiée dans cette étude rassemble des donneurs non-allergiques et non-asthmatiques ainsi que des individus allergiques et/ou asthmatiques sans

signes apparents de la maladie au moment du prélèvement. Tous semblaient répondre à l'IL-33 indépendamment de leur profil pathologique. Néanmoins, le nombre de donneurs était trop faible pour pouvoir faire des comparaisons quantitatives sur la capacité de répondre entre les différents groupes. De plus, il pouvait y avoir plus de variation dans la réponse des cellules provenant de deux prélèvements différents à partir d'un même donneur qu'entre les cellules de deux donneurs différents, suggérant un biais expérimental (e.g. variation dans la préparation des échantillons, dans les lots des produits utilisés) ou associé au donneur (e.g. infection récente ou latente asymptomatique).

3.4.3. Rôles de CysLT1 dans les lymphocytes T CD8⁺, NK et B

L'absence de réponse calcique et chimiotactique au LTD₄ dans les lymphocytes T CD8⁺ amène à s'interroger sur le rôle physiologique de l'expression du récepteur CysLT1 et de sa régulation dans ces cellules. De plus, l'augmentation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 a aussi été montrée dans les lymphocytes B et NK. L'IL-33 diminue l'activité cytotoxique des cellules NK placentaires en réprimant l'expression du récepteur NKG2D, de la perforine et du granzyme (Hu *et al.*, 2015). Au contraire, la production endogène des cysLTs et le récepteur CysLT1 participent à l'activité lytique des lymphocytes NK et T cytotoxiques du sang périphérique humain (Tang *et al.*, 2015). Dans les lymphocytes B, l'expression de CysLT1 peut être augmentée par la stimulation du CD40 en présence d'IL-4, et le LTD₄ augmente la production d'IgM et d'IgE (Lamoureux, 2006), alors que l'IL-33 induit la production d'IgM (Ahmed et Koma, 2015). Les interactions entre l'IL-33 et les cysLTs ainsi que la conséquence fonctionnelle de l'augmentation de l'expression de CysLT1 dans ces populations pourraient donc être explorées au niveau de l'activité cytotoxique et de la production d'anticorps.

3.4.4. Application à d'autres types cellulaires

Au cours d'une étude préliminaire, nous avons exploré la régulation de l'expression des récepteurs CysLT1 et CysLT2 dans les lymphocytes et monocytes du sang périphérique humain. Nos résultats nous indiquaient que l'IL-33 augmentait l'expression protéique de CysLT1 dans les lymphocytes mais pas dans les monocytes suggérant une action spécifique au type cellulaire. Parmi les lymphocytes, nous avons observé une réponse dans toutes les sous-populations étudiées (Chapitre 1). Dans la lignée lymphoïde, les cellules lymphoïdes innées (ILCs) qui sont dépourvues du récepteur TCR sont aussi capable de répondre à l'IL-

33 (Klose et Artis, 2016). Particulièrement, les ILC2s présentent des propriétés similaires aux lymphocytes Th2, sont résidentes dans la muqueuse bronchique, et peuvent être fortement activées en réponse à l'IL-33 via la voie Akt/mTOR (Salmond *et al.*, 2012). Les ILC2s expriment aussi le récepteur CysLT1, et l'expression de celui-ci est augmentée chez les patients atteints de dermatite atopique (Salimi *et al.*, 2017). Dans des modèles murins d'hyperréactivité bronchique, le LTC₄ augmente l'activation des ILC2s induite par l'IL-33 dépendamment du récepteur CysLT1 (Lund *et al.*, 2017; von Moltke *et al.*, 2017). Dans une de ces études, le niveau d'ARNm codant CysLT1 n'était pas affecté par l'IL-33 dans les ILC2s *in vitro* après 5h de stimulation, mais diminuait après 24h (Lund *et al.*, 2017). En revanche, l'expression de CysLT1 au niveau protéique n'a pas été explorée. Considérant nos résultats indiquant une modulation transitoire à 9h au niveau protéique dans les lymphocytes T, une étude sur la régulation de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 dans les ILC2s pourrait être envisagée.

4. PERTINENCE POUR D'AUTRES CONTEXTES INFLAMMATOIRES

Considérant l'expression préférentielle de ST2L par les cellules de type 2 (Th2, mastocytes, ILC2s) (Griesenauer et Paczesny, 2017), la propension de l'alarmine à induire la production des cytokines de type 2 (IL-5, IL-13) et à initier l'inflammation de type 2 *in vivo* (Allakhverdi *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2007; Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2005; Smithgall *et al.*, 2008; Stolarski *et al.*, 2010; Suzukawa *et al.*, 2008), l'IL-33 a été définie comme une cytokine pro-inflammatoire de type 2. Pourtant, en costimulation avec d'autres stimuli polarisants, l'IL-33 a été décrite comme pouvant potentialiser la différenciation et/ou les propriétés des lymphocytes Th2, Treg, Th1, Th17 ou Th9 (Blom *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012; Peine *et al.*, 2016). Ainsi, l'IL-33 ne définirait pas le profil de polarisation des lymphocytes T mais servirait plutôt à amplifier un profil défini par l'environnement cytokinique et cellulaire.

L'IL-33 et les cysLTs sont libérés simultanément dans d'autres contextes inflammatoires et/ou pathologiques tels que les infections parasitaires, virales ou fongiques (Bonilla *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016b; Rogerio et Anibal, 2012; Serezani *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011), la colite ulcéreuse (Pastorelli *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2015) et le développement tumoral (Akimoto et Takenaga, 2018; Mertz *et al.*, 2016; Savari *et al.*,

2014; Schmieder *et al.*, 2012). Rappelant que l'IL-33 et CysLT1 sont des éléments de l'immunité innée, l'augmentation induite par l'IL-33 de l'expression de CysLT1 et de la migration des lymphocytes T en réponse aux cysLTs pourrait être un mécanisme immun généralisé à divers contextes inflammatoires, où les lymphocytes naïfs et mémoires recrutés sans discrimination au site de l'inflammation sont ensuite activés ou réprimés dépendamment de la nature du danger et de l'environnement immun local.

CONCLUSION

Dans cette thèse, nous avons montré que l'IL-33 augmente l'expression du récepteur CysLT1 dans les lymphocytes du sang périphérique humain. L'IL-33 augmente ainsi la migration lymphocytaire en réponse au LTD₄, confortant le rôle de la cytokine dans la régulation du trafic lymphocytaire et l'initiation de la réponse inflammatoire.

Pour la première fois, l'évidence d'une action directe de l'IL-33 sur les cellules T naïves est apportée. Ces résultats suggèrent que l'IL-33 peut réguler des fonctions lymphocytaires innées souvent négligées. En effet, en favorisant l'infiltration des lymphocytes T naïfs, nous proposons que l'IL-33 peut indirectement promouvoir leur activation vers différents profils inflammatoires dépendamment de l'environnement immun prédominant.

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression de CysLT1 par l'IL-33 présente un nouveau mécanisme de régulation du récepteur par une cytokine. Ce modèle offre aussi l'opportunité de comprendre le rôle des transcrits alternatifs de CysLT1.

Finalement, bien plus que de démontrer la régulation de l'expression d'un récepteur par une cytokine, cette étude contribue à élargir les connaissances sur les mécanismes immuns potentiellement impliqués dans la pathologie de l'asthme et propose des nouvelles perspectives dans l'étude de l'IL-33 et du récepteur CysLT1.

REFERENCES

- Ahmed, A., and Koma, M.K. (2015). Interleukin-33 Triggers B1 Cell Expansion and Its Release of Monocyte/Macrophage Chemoattractants and Growth Factors. *Scand J Immunol* 82, 118-124.
- Akimoto, M., and Takenaga, K. (2018). Role of the IL-33/ST2L axis in colorectal cancer progression. *Cell Immunol*.
- Ali, S., Huber, M., Kollwe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., and Martin, M.U. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18660-18665.
- Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., and Martin, M.U. (2011). The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol* 187, 1609-1616.
- Ali, S., Nguyen, D.Q., Falk, W., and Martin, M.U. (2010). Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1512-1516.
- Allakhverdi, Z., Smith, D.E., Comeau, M.R., and Delespesse, G. (2007). Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 179, 2051-2054.
- Allan, D., Fairlie-Clarke, K.J., Elliott, C., Schuh, C., Barnett, S.C., Lassmann, H., Linnington, C., and Jiang, H.R. (2016). Role of IL-33 and ST2 signalling pathway in multiple sclerosis: expression by oligodendrocytes and inhibition of myelination in central nervous system. *Acta Neuropathol Commun* 4, 75.
- Amgen (2013). A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled, Ascending, Single Dose Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of AMG 282 in Healthy Subjects and Subjects With Mild Atopic Asthma (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01928368?term=amg+282&rank=2>).
- Amrani, Y., Moore, P.E., Hoffman, R., Shore, S.A., and Panettieri, R.A., Jr. (2001). Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 2098-2101.
- Andrade, M.V., Iwaki, S., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Cunha-Melo, J.R., and Beaven, M.A. (2011). Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol* 41, 760-772.
- Arshad, M.I., Patrat-Delon, S., Piquet-Pellorce, C., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Bleau, C., Lamontagne, L., and Samson, M. (2013). Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis. *PLoS One* 8, e74278.
- Asakura, T., Ishii, Y., Chibana, K., and Fukuda, T. (2004). Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-beta. *J Allergy Clin Immunol* 114, 310-315.
- Babolewska, E., Witczak, P., Pietrzak, A., and Brzezinska-Blaszczyk, E. (2012). Different potency of bacterial antigens TLR2 and TLR4 ligands in stimulating mature mast cells to cysteinyl leukotriene synthesis. *Microbiol Immunol* 56, 183-190.

Baekkevold, E.S., Roussigne, M., Yamanaka, T., Johansen, F.E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163, 69-79.

Ballerini, P., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Caciagli, F., Poli, A., Beraudi, A., Buccella, S., D'Alimonte, I., D'Auro, M., Nargi, E., *et al.* (2005). P2Y1 and cysteinyl leukotriene receptors mediate purine and cysteinyl leukotriene co-release in primary cultures of rat microglia. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18, 255-268.

Bandeira-Melo, C., Hall, J.C., Penrose, J.F., and Weller, P.F. (2002). Cysteinyl leukotrienes induce IL-4 release from cord blood-derived human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 109, 975-979.

Bankova, L.G., Lai, J., Yoshimoto, E., Boyce, J.A., Austen, K.F., Kanaoka, Y., and Barrett, N.A. (2016). Leukotriene E4 elicits respiratory epithelial cell mucin release through the G-protein-coupled receptor, GPR99. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 6242-6247.

Barrett, N.A., Fernandez, J.M., Maekawa, A., Xing, W., Li, L., Parsons, M.W., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2012). Cysteinyl leukotriene 2 receptor on dendritic cells negatively regulates ligand-dependent allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 189, 4556-4565.

Barrett, N.A., Maekawa, A., Rahman, O.M., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2009). Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol* 182, 1119-1128.

Barrett, N.A., Rahman, O.M., Fernandez, J.M., Parsons, M.W., Xing, W., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2011). Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *J Exp Med* 208, 593-604.

Baumann, C., Bonilla, W.V., Frohlich, A., Helmstetter, C., Peine, M., Hegazy, A.N., Pinschewer, D.D., and Lohning, M. (2015). T-bet- and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 4056-4061.

Becker, A.B., and Abrams, E.M. (2017). Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 17, 99-103.

Bergers, G., Reikerstorfer, A., Braselmann, S., Graninger, P., and Busslinger, M. (1994). Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J* 13, 1176-1188.

Besnard, A.G., Togbe, D., Guillou, N., Erard, F., Quesniaux, V., and Ryffel, B. (2011). IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 41, 1675-1686.

Bleck, B., Tse, D.B., Jaspers, I., Curotto de Lafaille, M.A., and Reibman, J. (2006). Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol* 176, 7431-7437.

Blom, L., Poulsen, B.C., Jensen, B.M., Hansen, A., and Poulsen, L.K. (2011). IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS One* 6, e21695.

Bloomfield, S.F., Rook, G.A., Scott, E.A., Shanahan, F., Stanwell-Smith, R., and Turner, P. (2016). Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspect Public Health* 136, 213-224.

- Bonilla, W.V., Frohlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreutzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., *et al.* (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8(+) T cell responses. *Science* 335, 984-989.
- Bonnelykke, K., and Ober, C. (2016). Leveraging gene-environment interactions and endotypes for asthma gene discovery. *J Allergy Clin Immunol* 137, 667-679.
- Borish, L. (2016). The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 117, 108-114.
- Bosse, Y., Thompson, C., McMahon, S., Dubois, C.M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2008). Leukotriene D4-induced, epithelial cell-derived transforming growth factor beta1 in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Clin Exp Allergy* 38, 113-121.
- Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., *et al.* (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 39, 1046-1055.
- Brint, E.K., Fitzgerald, K.A., Smith, P., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Fallon, P.G., and O'Neill, L.A. (2002). Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. *J Biol Chem* 277, 49205-49211.
- Brzezinska-Blaszczyk, E., and Rdzany, R.S. (2007). Lipoteichoic acids selectively stimulate rat mast cells to cysteinyl leukotriene generation and affect mast cell migration after tumor necrosis factor (TNF)-priming. *Immunol Lett* 109, 138-144.
- Buchan, J.R. (2014). mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol* 11, 1019-1030.
- Campbell, E.M., Charo, I.F., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Boring, L., Gosling, J., and Lukacs, N.W. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2-/- mice: the role of mast cells. *J Immunol* 163, 2160-2167.
- Capra, V., Accomazzo, M.R., Gardoni, F., Barbieri, S., and Rovati, G.E. (2010). A role for inflammatory mediators in heterologous desensitization of CysLT1 receptor in human monocytes. *J Lipid Res* 51, 1075-1084.
- Capra, V., Accomazzo, M.R., Ravasi, S., Parenti, M., Macchia, M., Nicosia, S., and Rovati, G.E. (2003). Involvement of prenylated proteins in calcium signaling induced by LTD4 in differentiated U937 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71, 235-251.
- Capra, V., Ravasi, S., Accomazzo, M.R., Citro, S., Grimoldi, M., Abbracchio, M.P., and Rovati, G.E. (2005). CysLT1 receptor is a target for extracellular nucleotide-induced heterologous desensitization: a possible feedback mechanism in inflammation. *J Cell Sci* 118, 5625-5636.
- Capra, V., Ravasi, S., Accomazzo, M.R., Parenti, M., and Rovati, G.E. (2004). CysLT1 signal transduction in differentiated U937 cells involves the activation of the small GTP-binding protein Ras. *Biochem Pharmacol* 67, 1569-1577.
- Capra, V., Rovati, G.E., Mangano, P., Buccellati, C., Murphy, R.C., and Sala, A. (2015). Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim Biophys Acta* 1851, 377-382.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.

- Carter, B.Z., Wiseman, A.L., Orkiszewski, R., Ballard, K.D., Ou, C.N., and Lieberman, M.W. (1997). Metabolism of leukotriene C4 in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *J Biol Chem* 272, 12305-12310.
- Castanhinha, S., Sherburn, R., Walker, S., Gupta, A., Bossley, C.J., Buckley, J., Ullmann, N., Grychtol, R., Campbell, G., Maglione, M., *et al.* (2015). Pediatric severe asthma with fungal sensitization is mediated by steroid-resistant IL-33. *J Allergy Clin Immunol* 136, 312-322 e317.
- Cayrol, C., and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9021-9026.
- Cayrol, C., and Girard, J.P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev* 281, 154-168.
- Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179, 2551-2555.
- Chan, W.L., Pejnovic, N., Lee, C.A., and Al-Ali, N.A. (2001). Human IL-18 receptor and ST2L are stable and selective markers for the respective type 1 and type 2 circulating lymphocytes. *J Immunol* 167, 1238-1244.
- Chapuis, J., Hot, D., Hansmannel, F., Kerdraon, O., Ferreira, S., Hubans, C., Maurage, C.A., Huot, L., Bensemain, F., Laumet, G., *et al.* (2009). Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 14, 1004-1016.
- Chaudhry, A., and Rudensky, A.Y. (2013). Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest* 123, 939-944.
- Chikaodinaka Ayuk, A., Ubesie, A., Laura Odimegwu, C., and Iloh, K. (2017). Use of Global initiative for asthma (GINA) guidelines in asthma management among paediatric residents in a Sub Saharan African country: a cross-sectional descriptive study. *Pan Afr Med J* 27, 120.
- Cho, K.A., Suh, J.W., Sohn, J.H., Park, J.W., Lee, H., Kang, J.L., Woo, S.Y., and Cho, Y.J. (2012). IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302, L429-440.
- Choi, G., Kim, B.S., Park, Y.J., Shim, I., and Chung, Y. (2017). Clonal Expansion of Allergen-specific CD4+ T Cell in the Lung in the Absence of Lymph Nodes. *Immune Netw* 17, 163-170.
- Choi, Y.S., Park, J.A., Kim, J., Rho, S.S., Park, H., Kim, Y.M., and Kwon, Y.G. (2012). Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF-kappaB p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 421, 305-311.
- Choo, A.Y., Yoon, S.O., Kim, S.G., Roux, P.P., and Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17414-17419.
- Cingi, C., Muluk, N.B., Ipci, K., and Sahin, E. (2015). Antileukotrienes in upper airway inflammatory diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 15, 64.
- Cohen, E.S., Scott, I.C., Majithiya, J.B., Rapley, L., Kemp, B.P., England, E., Rees, D.G., Overed-Sayer, C.L., Woods, J., Bond, N.J., *et al.* (2015). Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun* 6, 8327.

- Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J., and Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 186, 1737-1747.
- Cole, S.P., and Deeley, R.G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 27, 438-446.
- Cook, K.B., Kazan, H., Zuberi, K., Morris, Q., and Hughes, T.R. (2011). RBPDB: a database of RNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res* 39, D301-308.
- Covar, R.A. (2016). Pivotal efficacy trials of inhaled corticosteroids in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 117, 582-588.
- Cowan, D.C., Cowan, J.O., Palmay, R., Williamson, A., and Taylor, D.R. (2010). Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax* 65, 384-390.
- Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154, 4719-4725.
- Coyle, A.J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., *et al.* (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 190, 895-902.
- Crisafulli, E., Frizzelli, A., Fantin, A., Manco, A., Mangia, A., Pisi, G., Fainardi, V., Alfieri, V., Aiello, M., Bertorelli, G., *et al.* (2017). Next generation beta adrenoreceptor agonists for the treatment of asthma. *Expert Opin Pharmacother* 18, 1499-1505.
- Dahlen, S.E., Hedqvist, P., Hammarstrom, S., and Samuelsson, B. (1980). Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288, 484-486.
- Datta, Y.H., Romano, M., Jacobson, B.C., Golan, D.E., Serhan, C.N., and Ewenstein, B.M. (1995). Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 92, 3304-3311.
- Di Capite, J., Shirley, A., Nelson, C., Bates, G., and Parekh, A.B. (2009). Intercellular Ca²⁺ wave propagation involving positive feedback between CRAC channels and cysteinyl leukotrienes. *FASEB J* 23, 894-905.
- Diehl, J., Gries, B., Pfeil, U., Goldenberg, A., Mermer, P., Kummer, W., and Paddenberg, R. (2016). Expression and localization of GPR91 and GPR99 in murine organs. *Cell Tissue Res* 364, 245-262.
- Dixon, R.A., Diehl, R.E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P.J., Evans, J.F., Gillard, J.W., and Miller, D.K. (1990). Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343, 282-284.
- Doherty, T.A., Soroosh, P., Broide, D.H., and Croft, M. (2009). CD4+ cells are required for chronic eosinophilic lung inflammation but not airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L229-235.
- Drake, L.Y., Iijima, K., Hara, K., Kobayashi, T., Kephart, G.M., and Kita, H. (2015). B cells play key roles in th2-type airway immune responses in mice exposed to natural airborne allergens. *PLoS One* 10, e0121660.
- Dullaers, M., De Bruyne, R., Ramadani, F., Gould, H.J., Gevaert, P., and Lambrecht, B.N. (2012). The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 129, 635-645.

- Dunn, N.A., Neff, L.A., and Maurer, D.M. (2017). A stepwise approach to pediatric asthma. *J Fam Pract* 66, 280-286.
- Dvinge, H. (2018). Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. *FEBS Lett*.
- Eap, R., Jacques, E., Semlali, A., Plante, S., and Chakir, J. (2012). Cysteinyl leukotrienes regulate TGF-beta(1) and collagen production by bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 86, 127-133.
- Early, S.B., Barekzi, E., Negri, J., Hise, K., Borish, L., and Steinke, J.W. (2007). Concordant modulation of cysteinyl leukotriene receptor expression by IL-4 and IFN-gamma on peripheral immune cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 715-720.
- Eberl, G. (2016). Immunity by equilibrium. *Nat Rev Immunol* 16, 524-532.
- Elliot, J.G., Jensen, C.M., Mutavdzic, S., Lamb, J.P., Carroll, N.G., and James, A.L. (2004). Aggregations of lymphoid cells in the airways of nonsmokers, smokers, and subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 712-718.
- Endo, Y., Hirahara, K., Iinuma, T., Shinoda, K., Tumes, D.J., Asou, H.K., Matsugae, N., Obata-Ninomiya, K., Yamamoto, H., Motohashi, S., *et al.* (2015). The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 42, 294-308.
- Espinassous, Q., Garcia-de-Paco, E., Garcia-Verdugo, I., Synguelakis, M., von Aulock, S., Sallenave, J.M., McKenzie, A.N., and Kanellopoulos, J. (2009). IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol* 183, 1446-1455.
- Espinosa, K., Bosse, Y., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2003). CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1032-1040.
- Fehrenbach, H., Wagner, C., and Wegmann, M. (2017). Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res* 367, 551-569.
- Figueroa, D.J., Borish, L., Baramki, D., Philip, G., Austin, C.P., and Evans, J.F. (2003). Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 33, 1380-1388.
- Figueroa, D.J., Breyer, R.M., Defoe, S.K., Kargman, S., Daugherty, B.L., Waldburger, K., Liu, Q., Clements, M., Zeng, Z., O'Neill, G.P., *et al.* (2001). Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 226-233.
- Fraczek, M.G., Chishimba, L., Niven, R.M., Bromley, M., Simpson, A., Smyth, L., Denning, D.W., and Bowyer, P. (2017). Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol*.
- Fregonese, L., Silvestri, M., Sabatini, F., and Rossi, G.A. (2002). Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. *Clin Exp Allergy* 32, 745-750.
- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Hayakawa, M., Tominaga, S., Ohshio, T., Sonoda, Y., and Kasahara, T. (2008). TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal* 20, 1679-1686.

- Gauvreau, G.M., El-Gammal, A.I., and O'Byrne, P.M. (2015). Allergen-induced airway responses. *Eur Respir J* 46, 819-831.
- Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat Rev Genet*.
- Gerber, A.N. (2016). Measuring safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 117, 577-581.
- Ghosh, H.S., McBurney, M., and Robbins, P.D. (2010). SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One* 5, e9199.
- Glover, S., de Carvalho, M.S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C.C., and Gelb, M.H. (1995). Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* 270, 15359-15367.
- Gon, Y., and Hashimoto, S. (2018). Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 67, 12-17.
- Gopfert, C., Andreas, N., Weber, F., Hafner, N., Yakovleva, T., Gaestel, M., Kamradt, T., and Drube, S. (2018). The p38-MK2/3 Module Is Critical for IL-33-Induced Signaling and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Immunol* 200, 1198-1206.
- Gordon, E.D., Simpson, L.J., Rios, C.L., Ringel, L., Lachowicz-Scroggins, M.E., Peters, M.C., Wesolowska-Andersen, A., Gonzalez, J.R., MacLeod, H.J., Christian, L.S., *et al.* (2016). Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 8765-8770.
- Griesenauer, B., and Paczesny, S. (2017). The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 8, 475.
- Guilleminault, L., Oukssel, H., Belleguic, C., Le Guen, Y., Germaud, P., Desfleurs, E., Leroyer, C., and Magnan, A. (2017). Personalised medicine in asthma: from curative to preventive medicine. *Eur Respir Rev* 26.
- Gundersen, M.D., Goll, R., Hol, J., Olsen, T., Rismo, R., Sorbye, S.W., Sundnes, O., Haraldsen, G., and Florholmen, J. (2016). Loss of interleukin 33 expression in colonic crypts - a potential marker for disease remission in ulcerative colitis. *Sci Rep* 6, 35403.
- Guo, L., Huang, Y., Chen, X., Hu-Li, J., Urban, J.F., Jr., and Paul, W.E. (2015). Innate immunological function of TH2 cells in vivo. *Nat Immunol* 16, 1051-1059.
- Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W.J., Zhao, K., and Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13463-13468.
- Habib, G.M., Shi, Z.Z., Cuevas, A.A., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Lieberman, M.W. (1998). Leukotriene D4 and cystinyl-bis-glycine metabolism in membrane-bound dipeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4859-4863.
- Haeggstrom, J.Z., and Funk, C.D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111, 5866-5898.
- Halim, T.Y., Steer, C.A., Matha, L., Gold, M.J., Martinez-Gonzalez, I., McNagny, K.M., McKenzie, A.N., and Takei, F. (2014). Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* 40, 425-435.

- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15, 410-416.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43, 29-40.
- Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M.A., Kool, M., Muskens, F., and Lambrecht, B.N. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207, 2097-2111.
- Han, L., Zhang, M., Liang, X., Jia, X., Jia, J., Zhao, M., and Fan, Y. (2017). Interleukin-33 promotes inflammation-induced lymphangiogenesis via ST2/TRAF6-mediated Akt/eNOS/NO signalling pathway. *Sci Rep* 7, 10602.
- Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (1999). Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103, 175-183.
- Hardman, C., and Ogg, G. (2016). Interleukin-33, friend and foe in type-2 immune responses. *Curr Opin Immunol* 42, 16-24.
- He, W., Miao, F.J., Lin, D.C., Schwandner, R.T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J.L., Tian, H., and Ling, L. (2004). Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 429, 188-193.
- Heise, C.E., O'Dowd, B.F., Figueroa, D.J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D.S., Stocco, R., Bellefeuille, J.N., Abramovitz, M., Cheng, R., *et al.* (2000). Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275, 30531-30536.
- Henderson, W.R., Jr., Chiang, G.K., Tien, Y.T., and Chi, E.Y. (2006). Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 718-728.
- Henderson, W.R., Jr., Tang, L.O., Chu, S.J., Tsao, S.M., Chiang, G.K., Jones, F., Jonas, M., Pae, C., Wang, H., and Chi, E.Y. (2002). A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 108-116.
- Heyen, L., Muller, U., Siegemund, S., Schulze, B., Protschka, M., Alber, G., and Piehler, D. (2016). Lung epithelium is the major source of IL-33 and is regulated by IL-33-dependent and IL-33-independent mechanisms in pulmonary cryptococcosis. *Pathog Dis* 74.
- Hirabayashi, T., Murayama, T., and Shimizu, T. (2004). Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* 27, 1168-1173.
- Hirahara, K., Mato, N., Hagiwara, K., and Nakayama, T. (2018). The pathogenicity of IL-33 on steroid-resistant eosinophilic inflammation via the activation of memory-type ST2(+) CD4(+) T cells. *J Leukoc Biol*.
- Hofmann, B., and Steinhilber, D. (2013). 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent patents (2010-2012). *Expert Opin Ther Pat* 23, 895-909.
- Hong, J., Bae, S., Jhun, H., Lee, S., Choi, J., Kang, T., Kwak, A., Hong, K., Kim, E., Jo, S., *et al.* (2011). Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J Biol Chem* 286, 20078-20086.

- Hoshino, M., Izumi, T., and Shimizu, T. (1998). Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase Calpha-Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J Biol Chem* 273, 4878-4882.
- Hsieh, F.H., Lam, B.K., Penrose, J.F., Austen, K.F., and Boyce, J.A. (2001). T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C(4) synthase expression by interleukin 4. *J Exp Med* 193, 123-133.
- Hsu, C.L., Neilsen, C.V., and Bryce, P.J. (2010). IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS One* 5, e11944.
- Hu, W.T., Huang, L.L., Li, M.Q., Jin, L.P., Li, D.J., and Zhu, X.Y. (2015). Decidual stromal cell-derived IL-33 contributes to Th2 bias and inhibits decidual NK cell cytotoxicity through NF-kappaB signaling in human early pregnancy. *J Reprod Immunol* 109, 52-65.
- Hu, W.T., Li, M.Q., Liu, W., Jin, L.P., Li, D.J., and Zhu, X.Y. (2014). IL-33 enhances proliferation and invasiveness of decidual stromal cells by up-regulation of CCL2/CCR2 via NF-kappaB and ERK1/2 signaling. *Mol Hum Reprod* 20, 358-372.
- Hu, Z.Q., and Zhao, W.H. (2015). The IL-33/ST2 axis is specifically required for development of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 12, 521-524.
- Huber, M., Muller, J., Leier, I., Jedlitschky, G., Ball, H.A., Moore, K.P., Taylor, G.W., Williams, R., and Keppler, D. (1990). Metabolism of cysteinyl leukotrienes in monkey and man. *Eur J Biochem* 194, 309-315.
- Hung, C.H., Li, C.Y., Hua, Y.M., Chen, C.J., Yang, K.D., and Jong, Y.J. (2006). Effects of leukotriene receptor antagonists on monocyte chemotaxis, p38 and cytoplasmic calcium. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 250-258.
- Ichiyama, T., Hasegawa, M., Hashimoto, K., Matsushige, T., Hirano, R., and Furukawa, S. (2009). Cysteinyl leukotrienes induce macrophage inflammatory protein-1 in human monocytes/macrophages. *Int Arch Allergy Immunol* 148, 147-153.
- Ichiyama, T., Hasegawa, M., Ueno, Y., Makata, H., Matsubara, T., and Furukawa, S. (2005). Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein 1 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy* 35, 1214-1219.
- Ichiyama, T., Kajimoto, M., Hasegawa, M., Hashimoto, K., Matsubara, T., and Furukawa, S. (2007). Cysteinyl leukotrienes enhance tumour necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy* 37, 608-614.
- Islam, S.A., and Luster, A.D. (2012). T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18, 705-715.
- Ito, T., Hirose, K., Norimoto, A., Tamachi, T., Yokota, M., Saku, A., Takatori, H., Saijo, S., Iwakura, Y., and Nakajima, H. (2017). Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b+ Dendritic Cells. *J Immunol* 198, 61-70.
- Iwahana, H., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Tago, K., Yanagisawa, K., Noji, S., and Tominaga, S. (2004). Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta* 1681, 1-14.
- Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ito-Kosaka, A., Kuroiwa, K., Tago, K., Komatsu, N., Katashima, R., Itakura, M., and Tominaga, S. (1999). Different promoter usage and multiple transcription initiation

sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem* 264, 397-406.

Iwasaki, A., Foxman, E.F., and Molony, R.D. (2017). Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 17, 7-20.

Jackson, D.J., Makrinioti, H., Rana, B.M., Shamji, B.W., Trujillo-Torralbo, M.B., Footitt, J., Jerico, D.-R., Telcian, A.G., Nikonova, A., Zhu, J., *et al.* (2014). IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 190, 1373-1382.

Jackson, S.E., Holloway, J.W., Warner, J.A., and Sampson, A.P. (2012). Interleukin-13, but not indomethacin, increases cysteinyl-leukotriene synthesis in human lung macrophages. *J Allergy (Cairo)* 2012, 348741.

James, A.J., Penrose, J.F., Cazaly, A.M., Holgate, S.T., and Sampson, A.P. (2006). Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respir Res* 7, 102.

Jiang, Y., Borrelli, L.A., Kanaoka, Y., Bacskaï, B.J., and Boyce, J.A. (2007). CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. *Blood* 110, 3263-3270.

Joshi, A.D., Oak, S.R., Hartigan, A.J., Finn, W.G., Kunkel, S.L., Duffy, K.E., Das, A., and Hogaboam, C.M. (2010). Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol* 11, 52.

Just, J. (2013). Atopy is important in the management of asthma. *Paediatr Respir Rev* 14, 92-95.

Kakkar, R., and Lee, R.T. (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 7, 827-840.

Kamekura, R., Kojima, T., Takano, K., Go, M., Sawada, N., and Himi, T. (2012). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 42, 218-228.

Kanaoka, Y., Maekawa, A., and Austen, K.F. (2013). Identification of GPR99 protein as a potential third cysteinyl leukotriene receptor with a preference for leukotriene E4 ligand. *J Biol Chem* 288, 10967-10972.

Kaneko, I., Suzuki, K., Matsuo, K., Kumagai, H., Owada, Y., Noguchi, N., Hishinuma, T., and Ono, M. (2009). Cysteinyl leukotrienes enhance the degranulation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism. *Tohoku J Exp Med* 217, 185-191.

Kar, P., Bakowski, D., Di Capite, J., Nelson, C., and Parekh, A.B. (2012). Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6969-6974.

Kaur, D., and Brightling, C. (2012). OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest* 141, 494-499.

Kawagishi, Y., Mita, H., Taniguchi, M., Maruyama, M., Oosaki, R., Higashi, N., Kashii, T., Kobayashi, M., and Akiyama, K. (2002). Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 936-942.

Kawakami, M., Narumoto, O., Matsuo, Y., Horiguchi, K., Horiguchi, S., Yamashita, N., Sakaguchi, M., Lipp, M., Nagase, T., and Yamashita, N. (2012). The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cell Immunol* 275, 24-32.

- Kawano, T., Matsuse, H., Kondo, Y., Machida, I., Saeki, S., Tomari, S., Mitsuta, K., Obase, Y., Fukushima, C., Shimoda, T., *et al.* (2003). Cysteinyl leukotrienes induce nuclear factor kappa b activation and RANTES production in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 369-374.
- Kennedy, B.P., Diehl, R.E., Boie, Y., Adam, M., and Dixon, R.A. (1991). Gene characterization and promoter analysis of the human 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Biol Chem* **266**, 8511-8516.
- Kersten, E.T., and Koppelman, G.H. (2017). Pharmacogenetics of asthma: toward precision medicine. *Curr Opin Pulm Med* **23**, 12-20.
- Kim, M.H., Lee, Y.J., Kim, M.O., Kim, J.S., and Han, H.J. (2010). Effect of leukotriene D4 on mouse embryonic stem cell migration and proliferation: involvement of PI3K/Akt as well as GSK-3beta/beta-catenin signaling pathways. *J Cell Biochem* **111**, 686-698.
- Kim, S.H., Choi, J.H., Holloway, J.W., Suh, C.H., Nahm, D.H., Ha, E.H., Park, C.S., and Park, H.S. (2005). Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with aspirin-intolerant urticaria and aspirin-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. *J Korean Med Sci* **20**, 926-931.
- Kim, S.H., Oh, J.M., Kim, Y.S., Palmer, L.J., Suh, C.H., Nahm, D.H., and Park, H.S. (2006). Cysteinyl leukotriene receptor 1 promoter polymorphism is associated with aspirin-intolerant asthma in males. *Clin Exp Allergy* **36**, 433-439.
- Kiwamoto, T., Ishii, Y., Morishima, Y., Yoh, K., Kikuchi, N., Haraguchi, N., Masuko, H., Kawaguchi, M., Nomura, A., Sakamoto, T., *et al.* (2011). Blockade of cysteinyl leukotriene-1 receptors suppresses airway remodelling in mice overexpressing GATA-3. *Clin Exp Allergy* **41**, 116-128.
- Klose, C.S., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* **17**, 765-774.
- Komai-Koma, M., Gilchrist, D.S., McKenzie, A.N., Goodyear, C.S., Xu, D., and Liew, F.Y. (2011). IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol* **186**, 2584-2591.
- Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* **37**, 2779-2786.
- Kondeti, V., Duah, E., Al-Azzam, N., Thodeti, C.K., Boyce, J.A., and Paruchuri, S. (2013). Differential regulation of cysteinyl leukotriene receptor signaling by protein kinase C in human mast cells. *PLoS One* **8**, e71536.
- Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* **20**, 791-800.
- Kool, M., Willart, M.A., van Nimwegen, M., Bergen, I., Pouliot, P., Virchow, J.C., Rogers, N., Osorio, F., Reis e Sousa, C., Hammad, H., *et al.* (2011). An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity* **34**, 527-540.
- Krug, N., Madden, J., Redington, A.E., Lackie, P., Djukanovic, R., Schauer, U., Holgate, S.T., Frew, A.J., and Howarth, P.H. (1996). T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**, 319-326.

- Kuchler, A.M., Pollheimer, J., Balogh, J., Sponheim, J., Manley, L., Sorensen, D.R., De Angelis, P.M., Scott, H., and Haraldsen, G. (2008). Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol* **173**, 1229-1242.
- Kumar, S., Minnich, M.D., and Young, P.R. (1995). ST2/T1 protein functionally binds to two secreted proteins from Balb/c 3T3 and human umbilical vein endothelial cells but does not bind interleukin 1. *J Biol Chem* **270**, 27905-27913.
- Kumar, S., Tzimas, M.N., Griswold, D.E., and Young, P.R. (1997). Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 474-478.
- Kumasawa, F., Hashimoto, S., Mizumura, K., Takeshita, I., Onose, A., Jibiki, I., Maruoka, S., Gon, Y., Kobayashi, T., and Takahashi, N. (2013). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates leukotriene D4-induced HB-EGF and ADAM12 expression in human airway smooth muscle cells. *Asian Pac J Allergy Immunol* **31**, 58-66.
- Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., *et al.* (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* **181**, 4780-4790.
- Lai, Y., Altemeier, W.A., Vandree, J., Piliponsky, A.M., Johnson, B., Appel, C.L., Frevert, C.W., Hyde, D.M., Ziegler, S.F., Smith, D.E., *et al.* (2014). Increased density of intraepithelial mast cells in patients with exercise-induced bronchoconstriction regulated through epithelially derived thymic stromal lymphopoietin and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 1448-1455.
- Laidlaw, T.M., and Boyce, J.A. (2012). Cysteinyl leukotriene receptors, old and new; implications for asthma. *Clin Exp Allergy* **42**, 1313-1320.
- Laidlaw, T.M., Kidder, M.S., Bhattacharyya, N., Xing, W., Shen, S., Milne, G.L., Castells, M.C., Chhay, H., and Boyce, J.A. (2012). Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood* **119**, 3790-3798.
- Lam, B.K. (2003). Leukotriene C(4) synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**, 111-116.
- Lam, B.K., and Frank Austen, K. (2000). Leukotriene C4 synthase. A pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, S16-19.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 499-507.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2017). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat Immunol* **18**, 1076-1083.
- Lambrecht, B.N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R.A. (1998). Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* **160**, 4090-4097.
- Lavoie-Charland, E., Berube, J.C., Boulet, L.P., and Bosse, Y. (2016). Asthma susceptibility variants are more strongly associated with clinically similar subgroups. *J Asthma* **53**, 907-913.
- Lee, H.Y., Rhee, C.K., Kang, J.Y., Byun, J.H., Choi, J.Y., Kim, S.J., Kim, Y.K., Kwon, S.S., and Lee, S.Y. (2014). Blockade of IL-33/ST2 ameliorates airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Exp Lung Res* **40**, 66-76.

- Lefrancais, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., and Girard, J.P. (2014). Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15502-15507.
- Lefrancais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 1673-1678.
- Li, D., Guabiraba, R., Besnard, A.G., Komai-Koma, M., Jabir, M.S., Zhang, L., Graham, G.J., Kurowska-Stolarska, M., Liew, F.Y., McSharry, C., *et al.* (2014). IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* *134*, 1422-1432 e1411.
- Li, J., Zhang, L., Chen, X., Chen, D., Hua, X., Bian, F., Deng, R., Lu, F., Li, Z., Pflugfelder, S.C., *et al.* (2016). Pollen/TLR4 Innate Immunity Signaling Initiates IL-33/ST2/Th2 Pathways in Allergic Inflammation. *Sci Rep* *6*, 36150.
- Liew, F.Y., Girard, J.P., and Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* *16*, 676-689.
- Lin, T.H., Cheng, C.C., Su, H.H., Huang, N.C., Chen, J.J., Kang, H.Y., and Chang, T.H. (2016). Lipopolysaccharide Attenuates Induction of Proallergic Cytokines, Thymic Stromal Lymphopoietin, and Interleukin 33 in Respiratory Epithelial Cells Stimulated with PolyI:C and Human Parechovirus. *Front Immunol* *7*, 440.
- Liu, J., Xing, Y., Gao, Y., and Zhou, C. (2014). Changes in serum interleukin-33 levels in patients with acute cerebral infarction. *J Clin Neurosci* *21*, 298-300.
- Liu, S.R., Hu, C.G., and Zhang, J.Z. (2016). Regulatory effects of cotranscriptional RNA structure formation and transitions. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *7*, 562-574.
- Liu, T., Barrett, N.A., Kanaoka, Y., Yoshimoto, E., Garofalo, D., Cirka, H., Feng, C., and Boyce, J.A. (2018). Type 2 Cysteinyl Leukotriene Receptors Drive IL-33-Dependent Type 2 Immunopathology and Aspirin Sensitivity. *J Immunol* *200*, 915-927.
- Liu, X., Hammel, M., He, Y., Tainer, J.A., Jeng, U.S., Zhang, L., Wang, S., and Wang, X. (2013). Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 14918-14923.
- Llop-Guevara, A., Chu, D.K., Walker, T.D., Goncharova, S., Fattouh, R., Silver, J.S., Moore, C.L., Xie, J.L., O'Byrne, P.M., Coyle, A.J., *et al.* (2014). A GM-CSF/IL-33 pathway facilitates allergic airway responses to sub-threshold house dust mite exposure. *PLoS One* *9*, e88714.
- Lloyd, C.M., and Harker, J.A. (2016). Location, Location, Location: Localized Memory Cells Take Residence in the Allergic Lung. *Immunity* *44*, 13-15.
- Lloyd, C.M., and Marsland, B.J. (2017). Lung Homeostasis: Influence of Age, Microbes, and the Immune System. *Immunity* *46*, 549-561.
- Lohning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Levinson, D., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6930-6935.
- Loo, S.L., and Wark, P.A. (2016). Recent advances in understanding and managing asthma. *F1000Res* *5*.

- Louten, J., Rankin, A.L., Li, Y., Murphy, E.E., Beaumont, M., Moon, C., Bourne, P., McClanahan, T.K., Pflanz, S., and de Waal Malefyt, R. (2011). Endogenous IL-33 enhances Th2 cytokine production and T-cell responses during allergic airway inflammation. *Int Immunol* 23, 307-315.
- Loxham, M., Davies, D.E., and Blume, C. (2014). Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clin Exp Allergy* 44, 1299-1313.
- Lukacs, N.W., Oliveira, S.H., and Hogaboam, C.M. (1999). Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *J Clin Invest* 104, 995-999.
- Lund, S.J., Portillo, A., Cavagnero, K., Baum, R.E., Naji, L.H., Badrani, J.H., Mehta, A., Croft, M., Broide, D.H., and Doherty, T.A. (2017). Leukotriene C4 Potentiates IL-33-Induced Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation and Lung Inflammation. *J Immunol* 199, 1096-1104.
- Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., *et al.* (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.
- Lynch, K.R., O'Neill, G.P., Liu, Q., Im, D.S., Sawyer, N., Metters, K.M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D.J., Zeng, Z., *et al.* (1999). Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399, 789-793.
- Maekawa, A., Balestrieri, B., Austen, K.F., and Kanaoka, Y. (2009). GPR17 is a negative regulator of the cysteinyl leukotriene 1 receptor response to leukotriene D4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11685-11690.
- Magnusson, C., Ehrnstrom, R., Olsen, J., and Sjolander, A. (2007). An increased expression of cysteinyl leukotriene 2 receptor in colorectal adenocarcinomas correlates with high differentiation. *Cancer Res* 67, 9190-9198.
- Mahmutovic Persson, I., Menzel, M., Ramu, S., Cerps, S., Akbarshahi, H., and Uller, L. (2018). IL-1beta mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation. *Respir Res* 19, 16.
- Makrinioti, H., Toussaint, M., Jackson, D.J., Walton, R.P., and Johnston, S.L. (2014). Role of interleukin 33 in respiratory allergy and asthma. *Lancet Respir Med* 2, 226-237.
- Mancuso, P., and Peters-Golden, M. (2000). Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 727-733.
- Mangan, N.E., Dasvarma, A., McKenzie, A.N., and Fallon, P.G. (2007). T1/ST2 expression on Th2 cells negatively regulates allergic pulmonary inflammation. *Eur J Immunol* 37, 1302-1312.
- Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20, 254-257.
- Marcello, C., and Carlo, L. (2016). Asthma phenotypes: the intriguing selective intervention with Montelukast. *Asthma Res Pract* 2, 11.
- Martin, N.T., and Martin, M.U. (2016). Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17, 122-131.
- Mato, N., Hirahara, K., Ichikawa, T., Kumagai, J., Nakayama, M., Yamasawa, H., Bando, M., Hagiwara, K., Sugiyama, Y., and Nakayama, T. (2017). Memory-type ST2(+)CD4(+) T cells participate in the steroid-resistant pathology of eosinophilic pneumonia. *Sci Rep* 7, 6805.

- Matsuda, M., Tabuchi, Y., Nishimura, K., Nakamura, Y., Sekioka, T., Kadode, M., Kawabata, K., and Nabe, T. (2018). Increased expression of CysLT2 receptors in the lung of asthmatic mice and role in allergic responses. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 131, 24-31.
- Matta, B.M., and Turnquist, H.R. (2016). Expansion of Regulatory T Cells In Vitro and In Vivo by IL-33. *Methods Mol Biol* 1371, 29-41.
- Mayatepek, E., Meissner, T., and Grobe, H. (2004). Acute metabolic crisis with extreme deficiency of glutathione in combination with decreased levels of leukotriene C4 in a patient with glutathione synthetase deficiency. *J Inher Metab Dis* 27, 297-299.
- McAleer, J.P., and Kolls, J.K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur J Immunol* 48, 39-49.
- McCormick, C., and Khapersky, D.A. (2017). Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nat Rev Immunol* 17, 647-660.
- McCracken, J.L., Veeranki, S.P., Ameredes, B.T., and Calhoun, W.J. (2017). Diagnosis and Management of Asthma in Adults: A Review. *JAMA* 318, 279-290.
- McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1986). Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2204-2208.
- McKinley, L., Alcorn, J.F., Peterson, A., Dupont, R.B., Kapadia, S., Logar, A., Henry, A., Irvin, C.G., Piganelli, J.D., Ray, A., *et al.* (2008). TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181, 4089-4097.
- Meephansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Karakawa, M., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2013). Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *J Dermatol Sci* 71, 107-114.
- Meisel, C., Bonhagen, K., Lohning, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Radbruch, A., and Kamradt, T. (2001). Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J Immunol* 166, 3143-3150.
- Mellor, E.A., Austen, K.F., and Boyce, J.A. (2002). Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J Exp Med* 195, 583-592.
- Menard, G., and Bissonnette, E.Y. (2000). Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 572-577.
- Mertz, K.D., Mager, L.F., Wasmer, M.H., Thiesler, T., Koelzer, V.H., Ruzzante, G., Joller, S., Murdoch, J.R., Brummendorf, T., Genitsch, V., *et al.* (2016). The IL-33/ST2 pathway contributes to intestinal tumorigenesis in humans and mice. *Oncoimmunology* 5, e1062966.
- Mesquita-Santos, F.P., Bakker-Abreu, I., Luna-Gomes, T., Bozza, P.T., Diaz, B.L., and Bandeira-Melo, C. (2011). Co-operative signalling through DP(1) and DP(2) prostanoid receptors is required to enhance leukotriene C(4) synthesis induced by prostaglandin D(2) in eosinophils. *Br J Pharmacol* 162, 1674-1685.
- Mitchell, P.D., and O'Byrne, P.M. (2017). Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest* 151, 1338-1344.

- Mizutani, N., Nabe, T., and Yoshino, S. (2013). Interleukin-33 and alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and remodelling in mice. *Immunology* *139*, 205-218.
- Moldaver, D.M., Larche, M., and Rudulier, C.D. (2017). An Update on Lymphocyte Subtypes in Asthma and Airway Disease. *Chest* *151*, 1122-1130.
- Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon-gamma Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* *43*, 161-174.
- Montuschi, P. (2010). Role of Leukotrienes and Leukotriene Modifiers in Asthma. *Pharmaceuticals (Basel)* *3*, 1792-1811.
- Moritz, D.R., Rodewald, H.R., Gheyselinck, J., and Klemenz, R. (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* *161*, 4866-4874.
- Mortaz, E., Redegeld, F.A., Dunsmore, K., Odoms, K., Wong, H.R., Nijkamp, F.P., and Engels, F. (2007). Stimulation of cysteinyl leukotriene production in mast cells by heat shock and acetylsalicylic acid. *Eur J Pharmacol* *561*, 214-219.
- Moulin, D., Donze, O., Talabot-Ayer, D., Mezin, F., Palmer, G., and Gabay, C. (2007). Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* *40*, 216-225.
- Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* *3*, e3331.
- Muehling, L.M., Lawrence, M.G., and Woodfolk, J.A. (2017). Pathogenic CD4(+) T cells in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* *140*, 1523-1540.
- Mun, S.H., Ko, N.Y., Kim, H.S., Kim, J.W., Kim, D.K., Kim, A.R., Lee, S.H., Kim, Y.G., Lee, C.K., Lee, S.H., *et al.* (2010). Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci* *67*, 3883-3892.
- Mustoe, A.M., Corley, M., Laederach, A., and Weeks, K.M. (2018). Messenger RNA Structure Regulates Translation Initiation: A Mechanism Exploited from Bacteria to Humans. *Biochemistry*.
- Nabekura, T., Girard, J.P., and Lanier, L.L. (2015). IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. *J Immunol* *194*, 5948-5952.
- Naik, S., Billington, C.K., Pascual, R.M., Deshpande, D.A., Stefano, F.P., Kohout, T.A., Eckman, D.M., Benovic, J.L., and Penn, R.B. (2005). Regulation of cysteinyl leukotriene type 1 receptor internalization and signaling. *J Biol Chem* *280*, 8722-8732.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.* (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* *464*, 1367-1370.
- Ng, S.W., Bakowski, D., Nelson, C., Mehta, R., Almeyda, R., Bates, G., and Parekh, A.B. (2012). Cysteinyl leukotriene type I receptor desensitization sustains Ca²⁺-dependent gene expression. *Nature* *482*, 111-115.

- Nile, C.J., Barksby, E., Jitprasertwong, P., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2010). Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology* 130, 172-180.
- Ober, C. (2016). Asthma Genetics in the Post-GWAS Era. *Ann Am Thorac Soc* 13 Suppl 1, S85-90.
- Ohno, T., Oboki, K., Kajiwar, N., Morii, E., Aozasa, K., Flavell, R.A., Okumura, K., Saito, H., and Nakae, S. (2009). Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 183, 7890-7897.
- Oshikawa, K., Yanagisawa, K., Tominaga, S., and Sugiyama, Y. (2002). ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 18-24.
- Palmer, G., Lipsky, B.P., Smithgall, M.D., Meininger, D., Siu, S., Talabot-Ayer, D., Gabay, C., and Smith, D.E. (2008). The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine* 42, 358-364.
- Panettieri, R.A., Tan, E.M., Ciocca, V., Luttmann, M.A., Leonard, T.B., and Hay, D.W. (1998). Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 453-461.
- Papadaki, G., Bakakos, P., Kostikas, K., Hillas, G., Tsiligianni, Z., Koulouris, N.G., Papiris, S., and Loukides, S. (2013). Vascular endothelial growth factor and cysteinyl leukotrienes in sputum supernatant of patients with asthma. *Respir Med* 107, 1339-1345.
- Parameswaran, K., Cox, G., Radford, K., Janssen, L.J., Sehmi, R., and O'Byrne, P.M. (2002). Cysteinyl leukotrienes promote human airway smooth muscle migration. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 738-742.
- Parhamifar, L., Sime, W., Yudina, Y., Vilhardt, F., Morgelin, M., and Sjolander, A. (2010). Ligand-induced tyrosine phosphorylation of cysteinyl leukotriene receptor 1 triggers internalization and signaling in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 5, e14439.
- Park, I.H., Park, J.H., Shin, J.M., and Lee, H.M. (2016a). Tumor necrosis factor-alpha regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase, p38, and nuclear factor-kappaB pathways in airway epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol* 6, 973-980.
- Park, J.S., Chang, H.S., Park, C.S., Lee, J.H., Lee, Y.M., Choi, J.H., Park, H.S., Kim, L.H., Park, B.L., Choi, Y.H., *et al.* (2005). Association analysis of cysteinyl-leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics. *Pharmacogenet Genomics* 15, 483-492.
- Park, S.J., Cho, H.R., and Kwon, B. (2016b). Roles of IL-33 in Resistance and Tolerance to Systemic *Candida albicans* Infections. *Immune Netw* 16, 159-164.
- Parmentier, C.N., Fuerst, E., McDonald, J., Bowen, H., Lee, T.H., Pease, J.E., Woszczek, G., and Cousins, D.J. (2012). Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1136-1142.
- Pastorelli, L., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Vecchi, M. (2009). Emerging drugs for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Opin Emerg Drugs* 14, 505-521.
- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N., and Dahinden, C.A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113, 1526-1534.

- Pedersen, K.E., Bochner, B.S., and Udem, B.J. (1997). Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 655-662.
- Peine, M., Marek, R.M., and Lohning, M. (2016). IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol* 37, 321-333.
- Perng, D.W., Wu, Y.C., Chang, K.T., Wu, M.T., Chiou, Y.C., Su, K.C., Perng, R.P., and Lee, Y.C. (2006). Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 101-107.
- Peters-Golden, M., Gleason, M.M., and Togias, A. (2006). Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 36, 689-703.
- Pizzichini, E., Leff, J.A., Reiss, T.F., Hendeles, L., Boulet, L.P., Wei, L.X., Efthimiadis, A.E., Zhang, J., and Hargreave, F.E. (1999). Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J* 14, 12-18.
- Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswynghe, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., *et al.* (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322-335.
- Platts-Mills, T.A. (2001). The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S1-5.
- Poulin, S., Thompson, C., Thivierge, M., Veronneau, S., McMahon, S., Dubois, C.M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2011). Cysteinyl-leukotrienes induce vascular endothelial growth factor production in human monocytes and bronchial smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy* 41, 204-217.
- Prefontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemiere, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183, 5094-5103.
- Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 752-754.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., and McIntyre, T.M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69, 419-445.
- Provost, V., Langlois, A., Chouinard, F., Rola-Pleszczynski, M., Chakir, J., Flamand, N., and Laviolette, M. (2012). Leukotriene D4 and interleukin-13 cooperate to increase the release of eotaxin-3 by airway epithelial cells. *PLoS One* 7, e43544.
- Pruteanu, A.I., Chauhan, B.F., Zhang, L., Prietsch, S.O., and Ducharme, F.M. (2014). Inhaled corticosteroids in children with persistent asthma: dose-response effects on growth. *Cochrane Database Syst Rev*, CD009878.
- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol* 60, 1237-1243.
- Qi, F., Wang, D., Liu, J., Zeng, S., Xu, L., Hu, H., and Liu, B. (2015). Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner. *Int Immunopharmacol* 29, 408-415.

- Qi, L.L., Fang, S.H., Shi, W.Z., Huang, X.Q., Zhang, X.Y., Lu, Y.B., Zhang, W.P., and Wei, E.Q. (2011). CysLT2 receptor-mediated AQP4 up-regulation is involved in ischemic-like injury through activation of ERK and p38 MAPK in rat astrocytes. *Life Sci* 88, 50-56.
- Radmark, O., and Samuelsson, B. (2009). 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res* 50 Suppl, S40-45.
- Ramu, S., Menzel, M., Bjermer, L., Andersson, C., Akbarshahi, H., and Uller, L. (2018). Allergens produce serine proteases-dependent distinct release of metabolite DAMPs in human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 48, 156-166.
- Rank, M.A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K.R., Squillace, D.L., and Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1047-1054.
- Raught, B., and Gingras, A.C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 43-57.
- Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T.B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., *et al.* (2015). High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest* 125, 3037-3050.
- Rava, M., Smit, L.A., and Nadif, R. (2015). Gene-environment interactions in the study of asthma in the postgenomewide association studies era. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 15, 70-78.
- Ravasi, S., Citro, S., Viviani, B., Capra, V., and Rovati, G.E. (2006). CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res* 7, 42.
- Reddel, H.K., Bateman, E.D., Becker, A., Boulet, L.P., Cruz, A.A., Drazen, J.M., Haahtela, T., Hurd, S.S., Inoue, H., de Jongste, J.C., *et al.* (2015). A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J* 46, 622-639.
- Reynolds, L.A., and Finlay, B.B. (2017). Early life factors that affect allergy development. *Nat Rev Immunol* 17, 518-528.
- Riddick, C.A., Serio, K.J., Hodulik, C.R., Ring, W.L., Regan, M.S., and Bigby, T.D. (1999). TGF-beta increases leukotriene C4 synthase expression in the monocyte-like cell line, THP-1. *J Immunol* 162, 1101-1107.
- Rogerio, A.P., and Anibal, F.F. (2012). Role of leukotrienes on protozoan and helminth infections. *Mediators Inflamm* 2012, 595694.
- Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2007). Cytokine-leukotriene receptor interactions. *ScientificWorldJournal* 7, 1348-1358.
- Rossi, G.A., Cerasoli, F., and Cazzola, M. (2007). Safety of inhaled corticosteroids: room for improvement. *Pulm Pharmacol Ther* 20, 23-35.
- Roussel, L., Erard, M., Cayrol, C., and Girard, J.P. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 9, 1006-1012.
- Roux, P.P., and Topisirovic, I. (2018). Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Mol Cell Biol* 38.
- Russell, R.J., and Brightling, C. (2017). Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci (Lond)* 131, 1723-1735.

- Saccani, S., Polentarutti, N., Penton-Rol, G., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1998). Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Cytokine* 10, 773-780.
- Saito, K., Nagata, M., Kikuchi, I., and Sakamoto, Y. (2004). Leukotriene D4 and eosinophil transendothelial migration, superoxide generation, and degranulation via beta2 integrin. *Ann Allergy Asthma Immunol* 93, 594-600.
- Sala, A., Voelkel, N., Maclouf, J., and Murphy, R.C. (1990). Leukotriene E4 elimination and metabolism in normal human subjects. *J Biol Chem* 265, 21771-21778.
- Salazar, F., and Ghaemmaghami, A.M. (2013). Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Front Immunol* 4, 356.
- Salimi, M., Stoger, L., Liu, W., Go, S., Pavord, I., Klenerman, P., Ogg, G., and Xue, L. (2017). Cysteinyl leukotriene E4 activates human group 2 innate lymphoid cells and enhances the effect of prostaglandin D2 and epithelial cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 140, 1090-1100 e1011.
- Salmond, R.J., Mirchandani, A.S., Besnard, A.G., Bain, C.C., Thomson, N.C., and Liew, F.Y. (2012). IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1159-1166 e1156.
- Sanchez-Vasquez, E., Alata Jimenez, N., Vazquez, N.A., and Strobl-Mazzulla, P.H. (2018). Emerging role of dynamic RNA modifications during animal development. *Mech Dev*.
- Sarau, H.M., Ames, R.S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Muccitelli, R.M., Jenkins, O., Murdock, P.R., *et al.* (1999). Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56, 657-663.
- Sato, S., Yanagawa, Y., Hiraide, S., and Iizuka, K. (2016). Cyclic AMP signaling enhances lipopolysaccharide sensitivity and interleukin-33 production in RAW264.7 macrophages. *Microbiol Immunol* 60, 382-389.
- Savari, S., Vinnakota, K., Zhang, Y., and Sjolander, A. (2014). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20, 968-977.
- Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., *et al.* (2012). IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol* 132, 1392-1400.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., *et al.* (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513, 564-568.
- Schleimer, R.P., Freeland, H.S., Peters, S.P., Brown, K.E., and Derse, C.P. (1989). An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 598-605.
- Schmieder, A., Multhoff, G., and Radons, J. (2012). Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. *Cytokine* 60, 514-521.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.

- Schulze, J., Bickert, T., Beil, F.T., Zaiss, M.M., Albers, J., Wintges, K., Streichert, T., Klaetschke, K., Keller, J., Hissnauer, T.N., *et al.* (2011). Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res* 26, 704-717.
- Sekioka, T., Kadode, M., Fujii, M., Kawabata, K., Abe, T., Horiba, M., Kohno, S., and Nabe, T. (2015). Expression of CysLT2 receptors in asthma lung, and their possible role in bronchoconstriction. *Allergol Int* 64, 351-358.
- Sekioka, T., Kadode, M., Osakada, N., Fujita, M., Matsumura, N., Yamaura, Y., Nakade, S., Nabe, T., and Kawabata, K. (2017). A new CysLT1 and CysLT2 receptors-mediated anaphylaxis guinea pig model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 119, 18-24.
- Serezani, C.H., Aronoff, D.M., Jancar, S., Mancuso, P., and Peters-Golden, M. (2005). Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106, 1067-1075.
- Serio, K.J., Luo, C., Luo, L., and Mao, J.T. (2007). TNF-alpha downregulates the leukotriene C4 synthase gene in mononuclear phagocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L215-222.
- Sfakianos, A.P., Whitmarsh, A.J., and Ashe, M.P. (2016). Ribonucleoprotein bodies are phased in. *Biochem Soc Trans* 44, 1411-1416.
- Shan, J., Oshima, T., Wu, L., Fukui, H., Watari, J., and Miwa, H. (2016). Interferon gamma-Induced Nuclear Interleukin-33 Potentiates the Release of Esophageal Epithelial Derived Cytokines. *PLoS One* 11, e0151701.
- Shinoda, K., Hirahara, K., and Nakayama, T. (2017). Maintenance of pathogenic Th2 cells in allergic disorders. *Allergol Int* 66, 369-376.
- Shirasaki, H., Kanaizumi, E., and Himi, T. (2017a). Expression and localization of GPR99 in human nasal mucosa. *Auris Nasus Larynx* 44, 162-167.
- Shirasaki, H., Kanaizumi, E., and Himi, T. (2017b). Leukotriene D4 induces chemotaxis in human eosinophilic cell line, EoL-1 cells via CysLT1 receptor activation. *Heliyon* 3, e00464.
- Shirasaki, H., Kanaizumi, E., Watanabe, K., Matsui, T., Sato, J., Narita, S., Rautiainen, M., and Himi, T. (2002). Expression and localization of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy* 32, 1007-1012.
- Siede, J., Frohlich, A., Datsi, A., Hegazy, A.N., Varga, D.V., Holeciska, V., Saito, H., Nakae, S., and Lohning, M. (2016). IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGFbeta Release. *PLoS One* 11, e0161507.
- Silva, R.C., Landgraf, M.A., Hiyane, M.I., Pacheco-Silva, A., Camara, N.O., and Landgraf, R.G. (2010). Leukotrienes produced in allergic lung inflammation activate alveolar macrophages. *Cell Physiol Biochem* 26, 319-326.
- Sirois, P., and Borgeat, P. (1980). From slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) to leukotriene D4 (LTD4). *Int J Immunopharmacol* 2, 281-293.
- Sjolinder, M., Tornhamre, S., Werga, P., Edenius, C., and Lindgren, J.A. (1995). Phorbol ester-induced suppression of leukotriene C4 synthase activity in human granulocytes. *FEBS Lett* 377, 87-91.
- Sjostrom, M., Jakobsson, P.J., Heimbürger, M., Palmblad, J., and Haeggstrom, J.Z. (2001). Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C4 via microsomal glutathione S-transferase type 2 and express the CysLT(1) receptor. *Eur J Biochem* 268, 2578-2586.

- Sjostrom, M., Johansson, A.S., Schroder, O., Qiu, H., Palmblad, J., and Haeggstrom, J.Z. (2003). Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, e37-41.
- Skoner, D.P. (2016). Inhaled corticosteroids: Effects on growth and bone health. *Ann Allergy Asthma Immunol* 117, 595-600.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20, 1019-1030.
- Stiemsma, L.T., and Turvey, S.E. (2017). Asthma and the microbiome: defining the critical window in early life. *Allergy Asthma Clin Immunol* 13, 3.
- Stolarski, B., Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Xu, D., and Liew, F.Y. (2010). IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 185, 3472-3480.
- Sumi, Y., and Hamid, Q. (2007). Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 56, 341-348.
- Sun, J., Dahlen, B., Agerberth, B., and Haeggstrom, J.Z. (2013a). The antimicrobial peptide LL-37 induces synthesis and release of cysteinyl leukotrienes from human eosinophils--implications for asthma. *Allergy* 68, 304-311.
- Sun, L.H., Chen, A.H., Yang, Z.F., Chen, J.J., Guan, W.D., Wu, J.L., Qin, S., and Zhong, N.S. (2013b). Respiratory syncytial virus induces leukotriene C4 synthase expression in bronchial epithelial cells. *Respirology* 18 Suppl 3, 40-46.
- Suzukawa, M., Koketsu, R., Iikura, M., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagase, H., Saito, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., *et al.* (2008). Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 88, 1245-1253.
- Tagaya, E., and Tamaoki, J. (2007). Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 56, 331-340.
- Tago, K., Noda, T., Hayakawa, M., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Yashiro, T., and Tominaga, S. (2001). Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1377-1383.
- Takasaki, J., Kamohara, M., Matsumoto, M., Saito, T., Sugimoto, T., Ohishi, T., Ishii, H., Ota, T., Nishikawa, T., Kawai, Y., *et al.* (2000). The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 316-322.
- Takeda, T., Unno, H., Morita, H., Futamura, K., Emi-Sugie, M., Arae, K., Shoda, T., Okada, N., Igarashi, A., Inoue, E., *et al.* (2016). Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 138, 1395-1403 e1396.
- Tang, F., Sally, B., Lesko, K., Discepolo, V., Abadie, V., Ciszewski, C., Semrad, C., Guandalini, S., Kupfer, S.S., and Jabri, B. (2015). Cysteinyl leukotrienes mediate lymphokine killer activity induced by NKG2D and IL-15 in cytotoxic T cells during celiac disease. *J Exp Med* 212, 1487-1495.
- Tashiro, H., Takahashi, K., Hayashi, S., Kato, G., Kurata, K., Kimura, S., and Sueoka-Aragane, N. (2016). Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. *PLoS One* 11, e0157571.
- Teufelberger, A.R., Nordengrun, M., Braun, H., Maes, T., De Grove, K., Holtappels, G., O'Brien, C., Provoost, S., Hammad, H., Goncalves, A., *et al.* (2018). The IL-33/ST2 axis is crucial in type 2 airway

responses induced by *Staphylococcus aureus*-derived serine protease-like protein D. *J Allergy Clin Immunol* 141, 549-559 e547.

Thivierge, M., Doty, M., Johnson, J., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2000). IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165, 5221-5226.

Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2001). IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167, 2855-2860.

Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2006). Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1155-1162.

Thivierge, M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2009). Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: involvement of IL-10 and prostaglandins. *J Immunol* 183, 6778-6787.

Thivierge, M., Turcotte, S., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2015). Enhanced cysteinyl-leukotriene type 1 receptor expression in T cells from house dust mite-allergic individuals following stimulation with Der p. *J Immunol Res* 2015, 384780.

Thompson, C., Cloutier, A., Bosse, Y., Poisson, C., Larivee, P., McDonald, P.P., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2008a). Signaling by the cysteinyl-leukotriene receptor 2. Involvement in chemokine gene transcription. *J Biol Chem* 283, 1974-1984.

Thompson, C., Cloutier, A., Bosse, Y., Thivierge, M., Gouill, C.L., Larivee, P., McDonald, P.P., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2006). CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 697-704.

Thompson, C., McMahon, S., Bosse, Y., Dubois, C.M., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2008b). Leukotriene D4 up-regulates furin expression through CysLT1 receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 227-234.

Tokuriki, S., Ohshima, Y., Yamada, A., Ohta, N., Tsukahara, H., and Mayumi, M. (2007). Leukotriene D(4) enhances the function of endothelin-1-primed fibroblasts. *Clin Immunol* 125, 88-94.

Tominaga, S. (1989). A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 258, 301-304.

Tominaga, S., Kuroiwa, K., Tago, K., Iwahana, H., Yanagisawa, K., and Komatsu, N. (1999). Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 14-18.

Tominaga, S., Yokota, T., Yanagisawa, K., Tsukamoto, T., Takagi, T., and Tetsuka, T. (1992). Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta* 1171, 215-218.

Toskala, E., and Kennedy, D.W. (2015). Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol* 5 Suppl 1, S11-16.

Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191, 1069-1076.

Tsuda, H., Komine, M., Karakawa, M., Etoh, T., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2012). Novel splice variants of IL-33: differential expression in normal and transformed cells. *J Invest Dermatol* 132, 2661-2664.

Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., *et al.* (2011). IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 187, 4598-4610.

Uchida, M., Anderson, E.L., Squillace, D.L., Patil, N., Maniak, P.J., Iijima, K., Kita, H., and O'Grady, S.M. (2017). Oxidative stress serves as a key checkpoint for IL-33 release by airway epithelium. *Allergy* 72, 1521-1531.

Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Molofsky, A.B., Liang, H.E., Pollack, J.L., Gate, R.E., Haliburton, G.E., Ye, C.J., Marson, A., *et al.* (2016). A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol* 17, 1381-1387.

Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., and Libert, C. (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154, 993-1007.

Vannella, K.M., McMillan, T.R., Charbeneau, R.P., Wilke, C.A., Thomas, P.E., Toews, G.B., Peters-Golden, M., and Moore, B.B. (2007). Cysteinyl leukotrienes are autocrine and paracrine regulators of fibrocyte function. *J Immunol* 179, 7883-7890.

Verma, M., Liu, S., Michalec, L., Sripada, A., Gorska, M.M., and Alam, R. (2017). Experimental asthma persists in IL-33 receptor knockout mice because of the emergence of thymic stromal lymphopoietin-driven IL-9(+) and IL-13(+) type 2 innate lymphoid cell subpopulations. *J Allergy Clin Immunol*.

Virchow, J.C., Jr., Walker, C., Hafner, D., Kortsik, C., Werner, P., Matthys, H., and Kroegel, C. (1995). T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 960-968.

von Moltke, J., O'Leary, C.E., Barrett, N.A., Kanaoka, Y., Austen, K.F., and Locksley, R.M. (2017). Leukotrienes provide an NFAT-dependent signal that synergizes with IL-33 to activate ILC2s. *J Exp Med* 214, 27-37.

Vroman, H., van den Blink, B., and Kool, M. (2015). Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology* 220, 254-261.

Wang, Y., Bi, Y., Chen, X., Li, C., Li, Y., Zhang, Z., Wang, J., Lu, Y., Yu, Q., Su, H., *et al.* (2016). Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells. *Immunity* 44, 1337-1349.

Wei, J., Zhao, J., Schrott, V., Zhang, Y., Gladwin, M., Bullock, G., and Zhao, Y. (2015). Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. *J Investig Med* 63, 806-810.

Weinberg, E.O., Shimp, M., De Keulenaer, G.W., MacGillivray, C., Tominaga, S., Solomon, S.D., Rouleau, J.L., and Lee, R.T. (2002). Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* 106, 2961-2966.

Werz, O. (2002). 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 23-44.

- Wicher, G., Husic, E., Nilsson, G., and Forsberg-Nilsson, K. (2013). Developmental expression of IL-33 in the mouse brain. *Neurosci Lett* 555, 171-176.
- Wight, T.N., Frevert, C.W., Debley, J.S., Reeves, S.R., Parks, W.C., and Ziegler, S.F. (2017). Interplay of extracellular matrix and leukocytes in lung inflammation. *Cell Immunol* 312, 1-14.
- Willart, M.A., Deswarte, K., Pouliot, P., Braun, H., Beyaert, R., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med* 209, 1505-1517.
- Wittenberger, T., Hellebrand, S., Munck, A., Kreienkamp, H.J., Schaller, H.C., and Hampe, W. (2002). GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors. *BMC Genomics* 3, 17.
- Woszczek, G., Chen, L.Y., Nagineni, S., Alsaaty, S., Harry, A., Logun, C., Pawliczak, R., and Shelhamer, J.H. (2007). IFN-gamma induces cysteinyl leukotriene receptor 2 expression and enhances the responsiveness of human endothelial cells to cysteinyl leukotrienes. *J Immunol* 178, 5262-5270.
- Woszczek, G., Chen, L.Y., Nagineni, S., Kern, S., Barb, J., Munson, P.J., Logun, C., Danner, R.L., and Shelhamer, J.H. (2008). Leukotriene D(4) induces gene expression in human monocytes through cysteinyl leukotriene type I receptor. *J Allergy Clin Immunol* 121, 215-221 e211.
- Woszczek, G., Pawliczak, R., Qi, H.Y., Nagineni, S., Alsaaty, S., Logun, C., and Shelhamer, J.H. (2005). Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol* 175, 5152-5159.
- Wunder, F., Tinel, H., Kast, R., Geerts, A., Becker, E.M., Kolkhof, P., Hutter, J., Erguden, J., and Harter, M. (2010). Pharmacological characterization of the first potent and selective antagonist at the cysteinyl leukotriene 2 (CysLT(2)) receptor. *Br J Pharmacol* 160, 399-409.
- Wypych, T.P., Marzi, R., Wu, G.F., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2018). Role of B cells in TH cell responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 141, 1395-1410.
- Xie, M., and Wenzel, S.E. (2013). A global perspective in asthma: from phenotype to endotype. *Chin Med J (Engl)* 126, 166-174.
- Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J.H., and Liew, F.Y. (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 187, 787-794.
- Xue, L., Salimi, M., Panse, I., Mjosberg, J.M., McKenzie, A.N., Spits, H., Klenerman, P., and Ogg, G. (2014). Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol* 133, 1184-1194.
- Yamashita, N., Tashimo, H., Matsuo, Y., Ishida, H., Yoshiura, K., Sato, K., Yamashita, N., Kakiuchi, T., and Ohta, K. (2006). Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the ovalbumin-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1040-1046.
- Yan, D., Stocco, R., Sawyer, N., Nesheim, M.E., Abramovitz, M., and Funk, C.D. (2011). Differential signaling of cysteinyl leukotrienes and a novel cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT(2)) agonist, N-methyl-leukotriene C(4), in calcium reporter and beta arrestin assays. *Mol Pharmacol* 79, 270-278.
- Yanagawa, Y., Matsumoto, M., and Togashi, H. (2011a). Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. *Brain Behav Immun* 25, 1427-1433.

- Yanagawa, Y., Suzuki, M., Matsumoto, M., and Togashi, H. (2011b). Prostaglandin E(2) enhances IL-33 production by dendritic cells. *Immunol Lett* 141, 55-60.
- Yanagisawa, K., Takagi, T., Tsukamoto, T., Tetsuka, T., and Tominaga, S. (1993). Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett* 318, 83-87.
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, O.J., Chen, X., and Lu, B. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 41, 3351-3360.
- Yin, H., Li, X., Hu, S., Liu, T., Yuan, B., Gu, H., Ni, Q., Zhang, X., and Zheng, F. (2013). IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol Immunol* 56, 347-353.
- Zaiss, M.M., Kurowska-Stolarska, M., Bohm, C., Gary, R., Scholtysek, C., Stolarski, B., Reilly, J., Kerr, S., Millar, N.L., Kamradt, T., *et al.* (2011). IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol* 186, 6097-6105.
- Zhao, J., Wei, J., Bowser, R.K., Traister, R.S., Fan, M.H., and Zhao, Y. (2015). Focal adhesion kinase-mediated activation of glycogen synthase kinase 3beta regulates IL-33 receptor internalization and IL-33 signaling. *J Immunol* 194, 795-802.
- Zhao, J., Wei, J., Mialki, R.K., Mallampalli, D.F., Chen, B.B., Coon, T., Zou, C., Mallampalli, R.K., and Zhao, Y. (2012). F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nat Immunol* 13, 651-658.
- Zhiguang, X., Wei, C., Steven, R., Wei, D., Wei, Z., Rong, M., Zhanguo, L., and Lianfeng, Z. (2010). Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett* 131, 159-165.
- Zhong, W., Su, W., Zhang, Y., Liu, Q., Wu, J., Di, C., Zhang, Z., and Xia, Z. (2014). Basophils as a primary inducer of the T helper type 2 immunity in ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Immunology* 142, 202-215.
- Zhu, J., Qiu, Y.S., Figueroa, D.J., Bandi, V., Galczynski, H., Hamada, K., Guntupalli, K.K., Evans, J.F., and Jeffery, P.K. (2005). Localization and upregulation of cysteinyl leukotriene-1 receptor in asthmatic bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 531-540.
- Zhu, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhao, J., Meng, X., Chen, S., Wang, T., Li, X., Zhang, L., Lu, C., *et al.* (2017). IL-33 induces both regulatory B cells and regulatory T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 46, 38-47.
- Zhu, J., Yang, F., Sang, L., Zhai, J., Zhang, X., Yue, D., Li, S., Li, Y., Lu, C., and Sun, X. (2015). IL-33 Aggravates DSS-Induced Acute Colitis in Mouse Colon Lamina Propria by Enhancing Th2 Cell Responses. *Mediators Inflamm* 2015, 913041.
- Zoltowska Nilsson, A.M., Lei, Y., Adner, M., and Nilsson, G.P. (2018). Mast cell-dependent IL-33/ST2 signaling is protective against the development of airway hyperresponsiveness in a house dust mite mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 314, L484-L492.

ANNEXES

Figure S1

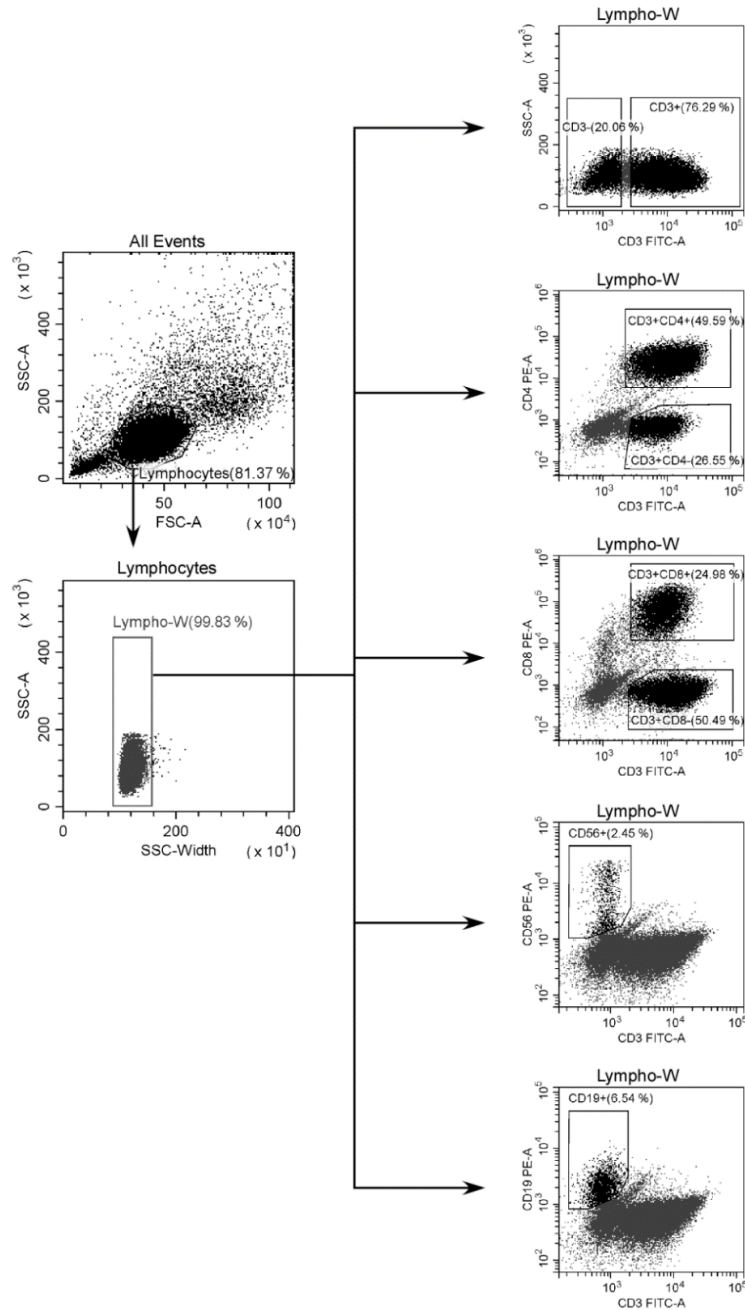


Figure S1. Gating strategy for analysis of CysLT1 expression in lymphocyte populations. Peripheral blood lymphocytes were fixed and permeabilized as described in *Materials and Methods* and labelled with anti-human CD3 (FITC) and CD4 (PE) or CD8 (PE) or CD19 (PE) or CD56 (PE). For each labelling, lymphocytes were first gated according to granularity and cell doublets were excluded with SSC-Width. For each gate, CysLT1 expression was measured following Cy5 fluorescence intensity.

Figure S2

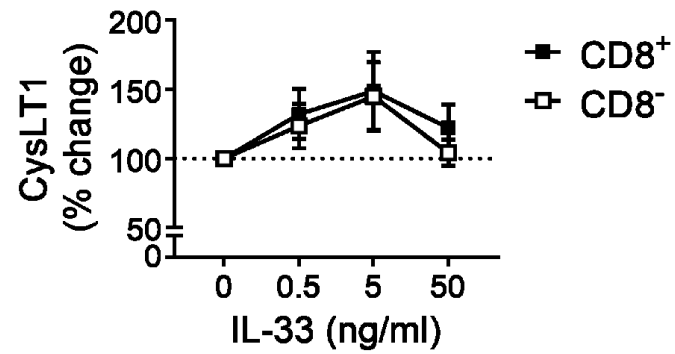


Figure S2. Modulation of CysLT1 expression in CD8⁺ T cells after IL-33 stimulation. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h. CysLT1 expression was measured by flow cytometry in CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD8⁻ cells. Data are presented as mean±SEM, n=5.

Figure S3

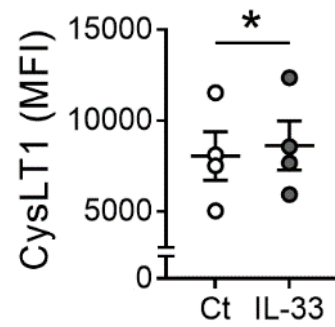


Figure S3. IL-33-induced CysLT1 upregulation in non-permeabilized CD3⁺ cells. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated for 9h with 5ng/ml IL-33. Surface CysLT1 expression was measured by flow cytometry in gated CD3⁺ cells. *p<0.05, paired t-test, n=4.

Figure S4

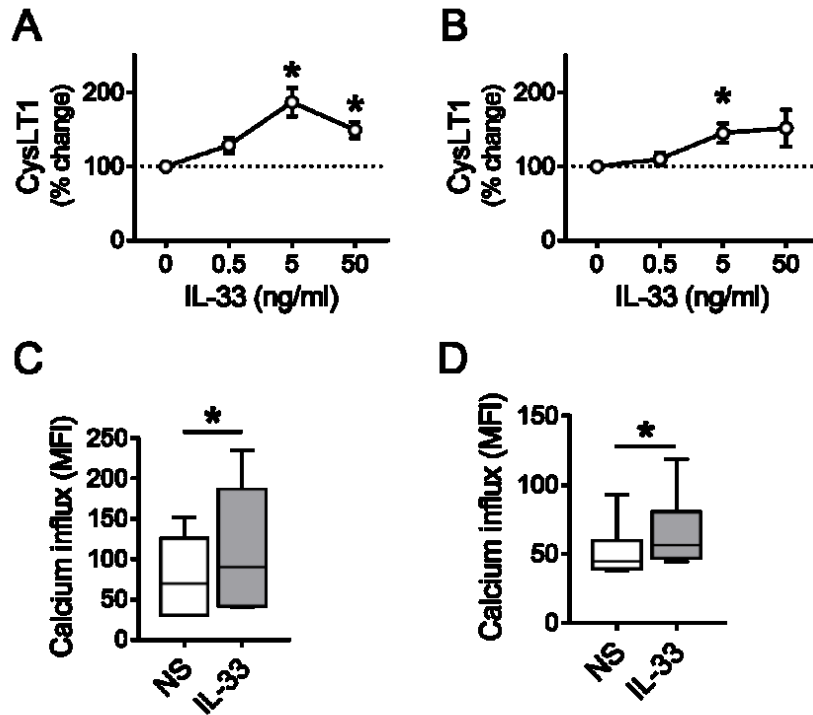


Figure S4. Modulation of CysLT1 expression and LTD₄-induced calcium influx by IL-33 in B and NK cells. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with increasing concentrations of IL-33 for 9h. Cells were labeled with lineage-specific antibodies before CysLT1 expression measurement (A and B) or LTD₄-induced calcium influx assay (C and D) by flow cytometry in gated CD19⁺ (A and C) or CD56⁺ cells (B and D). Data are presented as mean±SEM. (A and B) *p<0.05 versus untreated condition, one-way ANOVA, Dunnett's posttest, n=7. (C and D) *p<0.05, paired t-test, n=7.

Figure S5

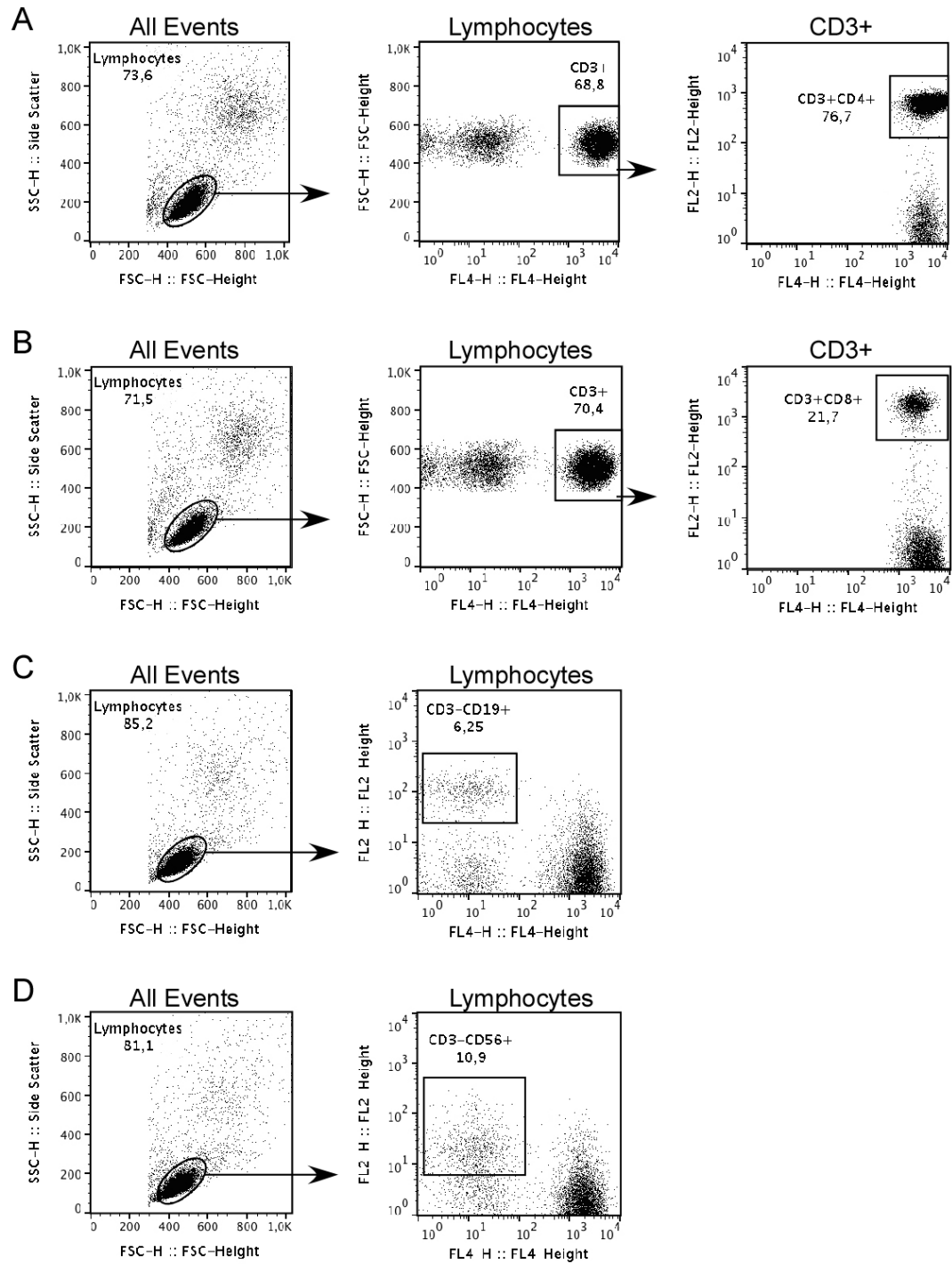


Figure S5. Gating strategy for analysis of LTD₄-induced calcium mobilisation in lymphocyte populations. Peripheral blood lymphocytes were labelled with anti-human CD3 (APC) and CD4 (PE) or CD8 (PE) or CD19 (PE) or CD56 (PE), before LTD₄-induced calcium influx measurement as described in *Materials and Methods*. For each labelling, lymphocytes were first gated according to granularity. For each gate, intracellular calcium concentration was measured following Fluo-3 fluorescence intensity (FL1 channel).

Figure S6

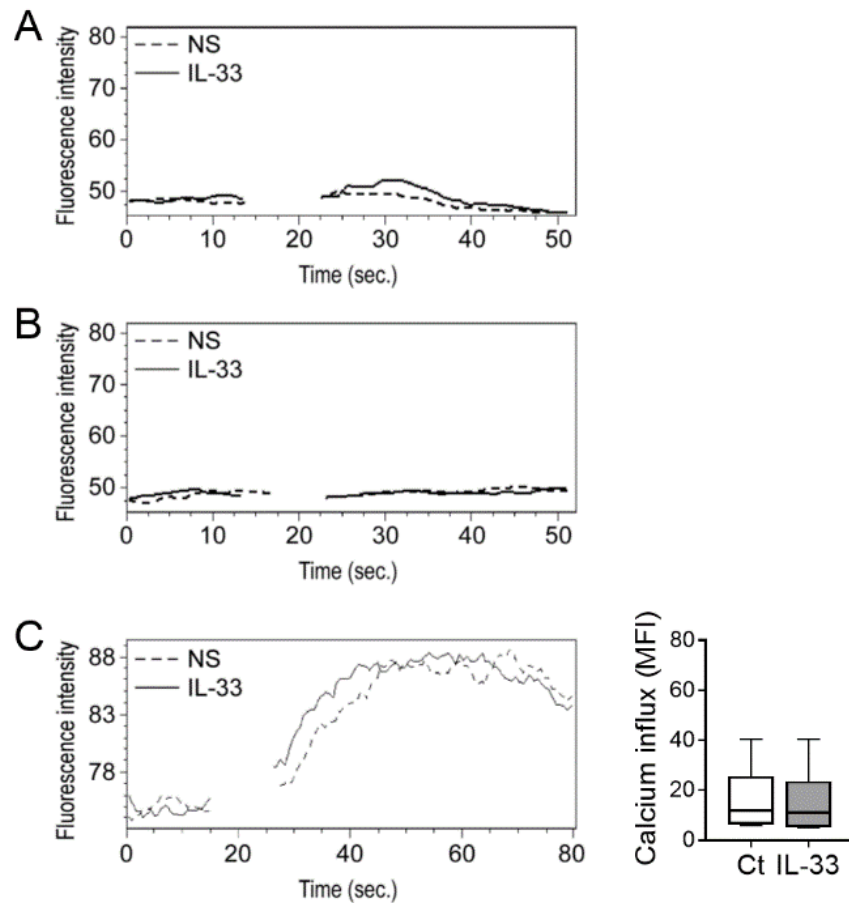


Figure S6. Modulation of LTC₄-, LTE₄- and SDF-1-induced calcium influx by IL-33 in CD3⁺ cells. Enriched peripheral blood lymphocytes were stimulated with 5ng/ml of IL-33 for 9h. Cells were labeled with anti-CD3 specific antibodies before calcium influx measurement in response to 10⁻⁷M LTC₄ (A), 10⁻⁷M LTE₄ (B) or 5ng/ml SDF-1 (C) by flow cytometry in gated CD3⁺ cells. One representative experiment of 4 is shown. SDF-1-induced calcium response intensities are compiled in the graph.

Figure S7

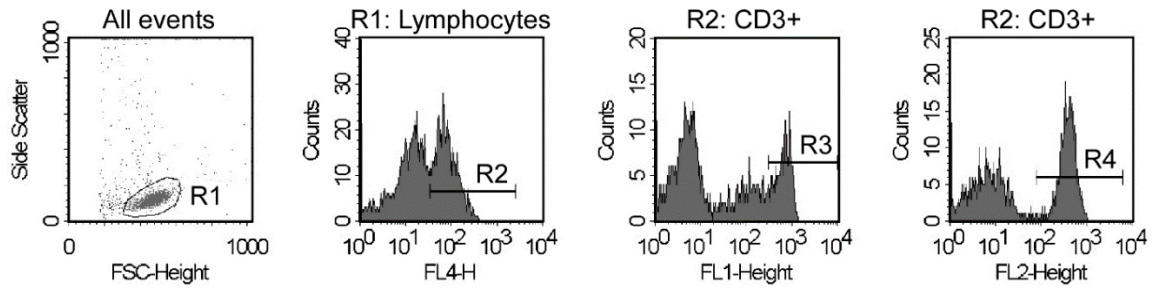


Figure S7. Gating strategy for analysis of LTD₄-induced chemotaxis in lymphocyte populations. Peripheral blood lymphocytes were stimulated with IL-33 and labelled with anti-human CD3 (APC) and CD4 (PE) and CD8 (FITC), before LTD₄-induced calcium influx measurement as described in *Materials and Methods*. Migrated cells were counted on a FACSCALIBUR cytometer (BD BioSciences). For each labelling, lymphocytes (R1) were first gated according to granularity. CD3⁺ cells (R2) were gated among lymphocytes and, CD8⁺ (R3) and CD4⁺ (R4) cells were gated among CD3⁺ cells.

Figure S8

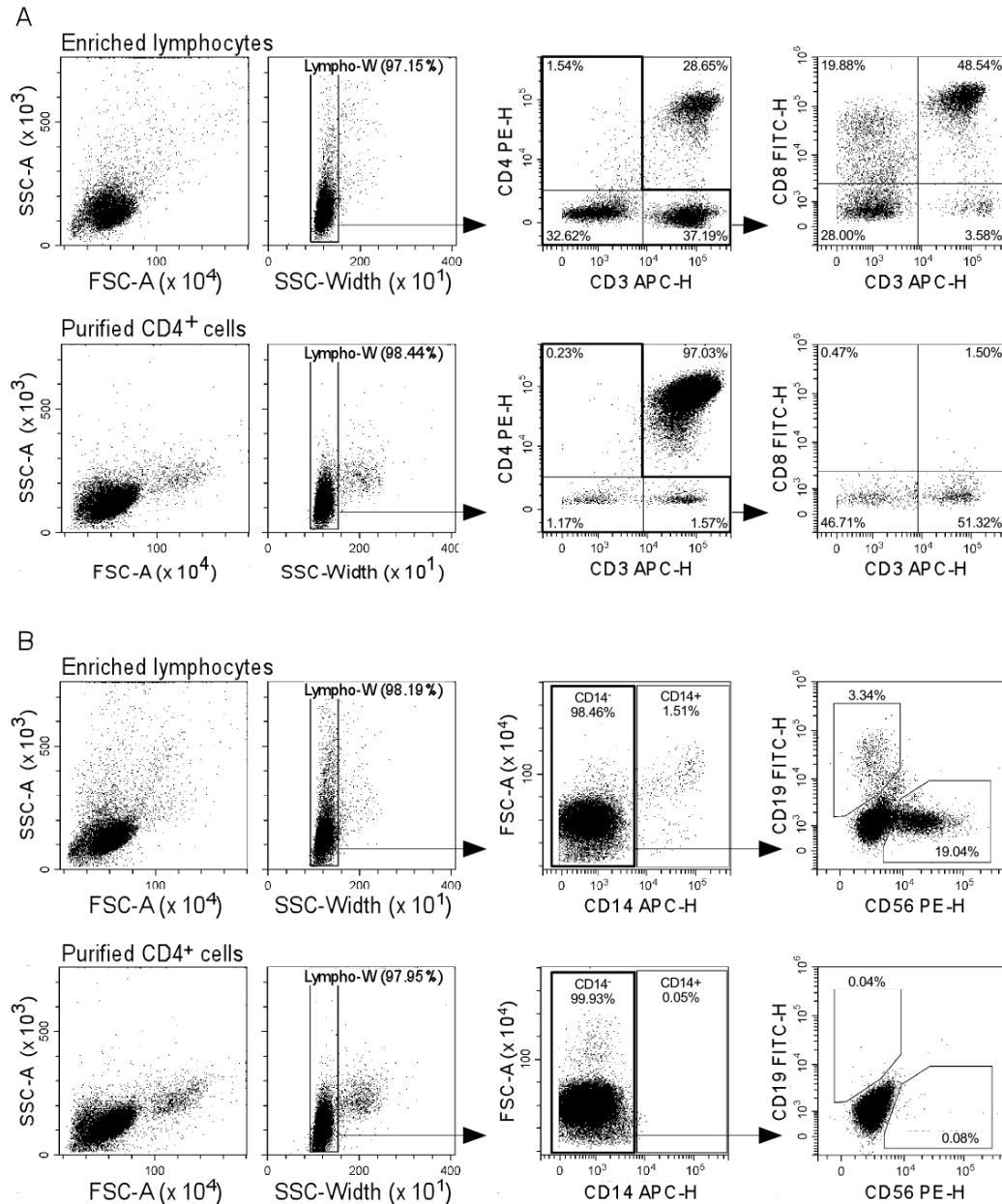


Figure S8. Purity of enriched CD4⁺ cells. (A) Peripheral blood lymphocytes and negatively selected CD4⁺ cells were labeled with anti-human CD3-APC, CD4-PE and CD8-FITC antibodies and analyzed by flow cytometry. Purity of CD3⁺CD4⁺ was first assessed. Among contaminating cells, half were CD3⁺CD4⁺CD8⁻ and half were CD3⁻ cells. (B) Peripheral blood lymphocytes and negatively selected CD4⁺ cells were labeled with anti-human CD14-APC, CD56-PE and CD19-FITC antibodies and analyzed by flow cytometry. Whereas CD14⁺, CD19⁺ and CD56⁺ populations were well detected in peripheral blood lymphocytes, they were efficiently depleted in enriched CD4⁺ cells.

Figure S9

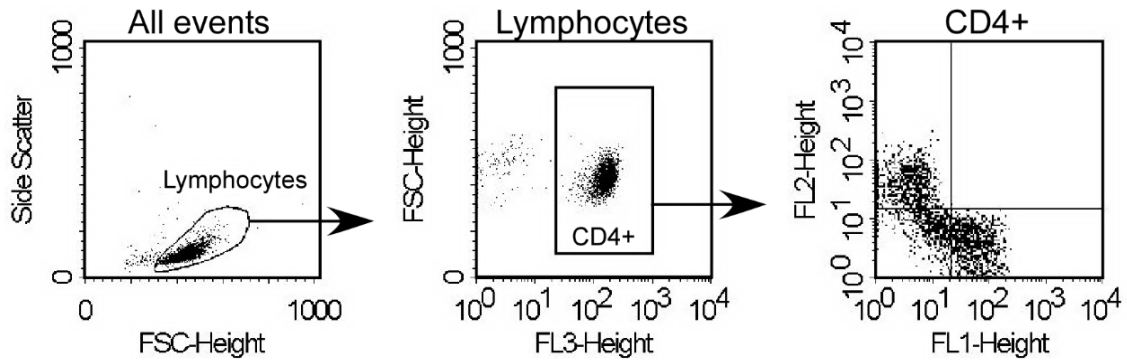


Figure S9. Gating strategy for analysis of LTD₄-induced chemotaxis in CD4⁺CD45RA⁺ and CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes. Negatively selected CD4⁺ cells were stimulated with IL-33 and labelled with anti-human CD3 (APC) and CD4 (PE) and CD8 (FITC), before LTD₄-induced chemotaxis assay as described in *Materials and Methods*. Migrated cells were counted on a FACSCALIBUR cytometer (BD BioSciences). For each labelling, lymphocytes were first gated according to granularity. CD4⁺ cells (R2) were gated among lymphocytes and, CD45RA⁺ (FL1-Height⁺) and CD45RO⁺ (FL2-Height⁺) cells were gated among CD4⁺ cells (FL3-Height⁺).

Figure S10

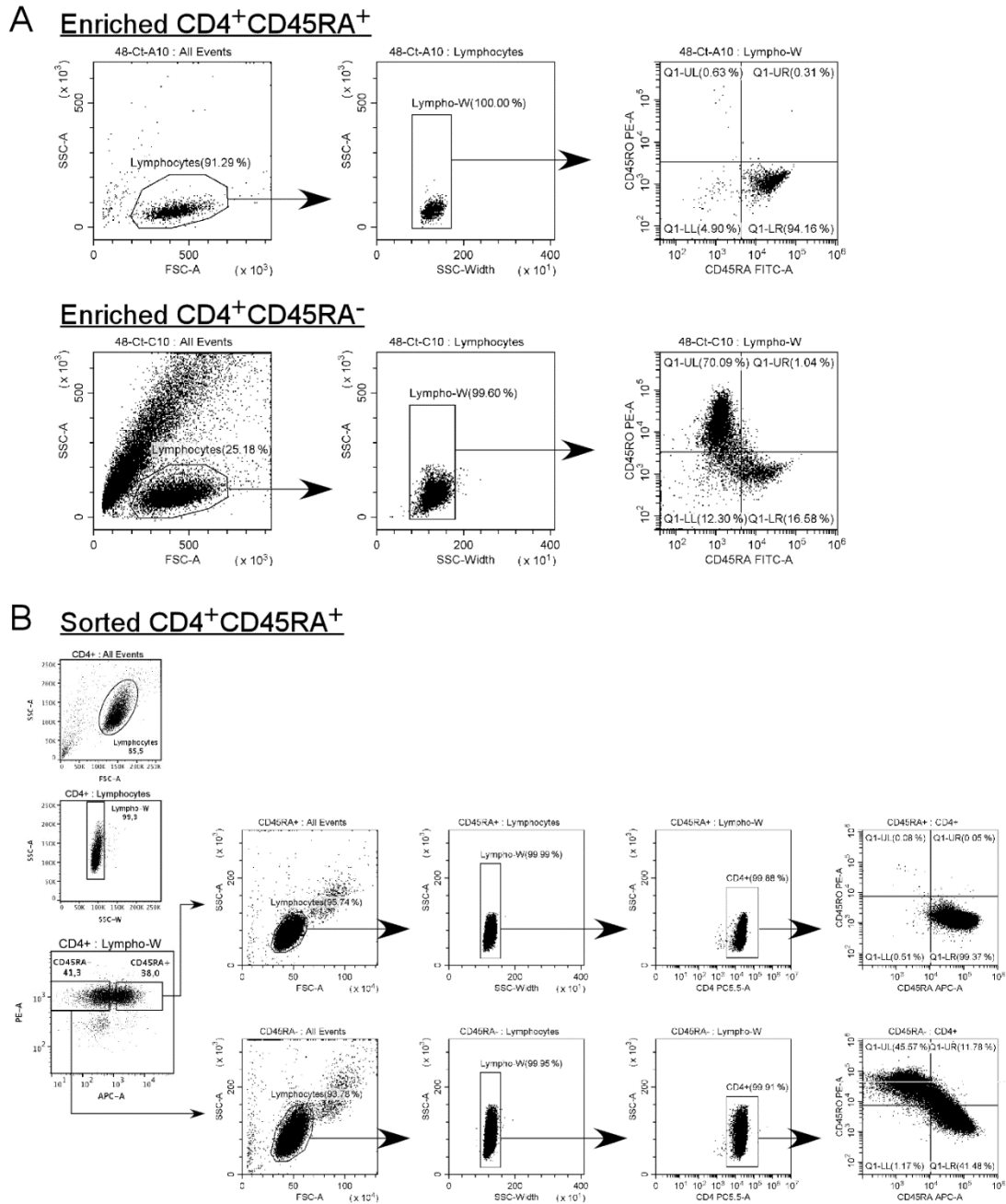


Figure S10. Purity of purified $CD45RA^+$ cells. (A) $CD4^+CD45RA^+$ cells were purified by negative selection from negatively selected $CD4^+$ cells and labelled with conjugated anti- $CD45RA$ (FITC) and anti- $CD45RO$ (PE). Positively selected $CD4^+CD45RA^-$ cells are shown for comparison. (B) negatively selected $CD4^+$ cells were labelled with conjugated anti- $CD45RA$ (APC) and anti- $CD4$ (TRITC) antibodies and $CD4^+CD45RA^+$ cells were sorted with a BD FACSaria™ III. Sorted cells were then labelled with conjugated anti- $CD4$ (PercpCy5), anti- $CD45RA$ (APC) and anti- $CD45RO$ (PE) antibodies and purity was assessed on a CytoFLEX flow cytometer devoid of TRITC-excitatory laser. Sorted $CD4^+CD45RA^-$ cells are shown for comparison.